



UNIVERSITAT JAUME I

Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals

Departament de Química Inorgànica i Orgànica

**SÍNTESIS DE ANÁLOGOS
DE RESVERATROL Y DE RODANINA
Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Tesis Doctoral

Rosa Martí Centelles

Castellón de la Plana, 2015

D. Miguel Carda Usó, Catedrático de Química Orgánica de la Universitat Jaume I y D^a. Eva Falomir Ventura, Profesora Titular de Química Orgánica de la Universitat Jaume I, hacen constar que:

D^a. Rosa Martí Centelles ha realizado bajo su dirección el trabajo que se recoge en esta memoria para optar al grado de Doctora.

Asimismo, autorizan la presentación del trabajo ante la Universitat Jaume I de Castelló para que se cumplan los trámites correspondientes.

Y para que así conste a los efectos legales presentamos dicha Tesis y firmamos este certificado en Castellón de la Plana a 12 de junio de dos mil quince.

Miguel Carda Usó

Eva Falomir Ventura

Agradecimientos

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales de la Universitat Jaume I de Castellón de la Plana, bajo la dirección del Dr. D. Miguel Carda Usó y de la Dra. D.^a Eva Falomir Ventura, a quienes quiero manifestar mi más sincero agradecimiento por toda la ayuda y confianza depositada en mí durante todos estos años y por brindarme la oportunidad de empezar este proyecto. Gracias por las horas de dedicación, por vuestras enseñanzas y por vuestro esfuerzo para que este trabajo saliera adelante. También quiero extender mi agradecimiento a los doctores Juan Murga y Alberto Marco por sus valiosos consejos y su implicación en esta Tesis.

Me gustaría expresar mi gratitud a la Universitat Jaume I por la concesión de una ayuda predoctoral, gracias a la cual he podido llevar a cabo la investigación que se recoge en esta memoria, y por la concesión de una ayuda de movilidad, que me ha permitido realizar una estancia de investigación de tres meses en la universidad de Siena (Italia).

Asimismo, también quiero agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión del proyecto CTQ2011-27560, a la Universidad Jaume I por la concesión del proyecto PI-1B2011-37 y a la Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciència de la Generalitat Valenciana por la concesión de los proyectos PROMETEO 2013/027 y ACOMP 2013/208, gracias a los cuales se ha podido financiar la investigación presentada en esta Tesis Doctoral.

Hago extensivo mi agradecimiento al profesor Maurizio Botta y a todo su grupo de investigación por el trato que me dispensaron durante mi estancia en la Universidad de Siena. También agradezco la gentileza del Dr. D Juan Carlos Morales por la cesión de una batería de compuestos que se utilizaron en la realización de ensayos biológicos que se recogen en esta memoria.

Quiero manifestar mi más sincera gratitud a los doctores Santi Díaz y Rocío Cejudo por todos los conocimientos que me han transmitido en los campos de la química y la biología, respectivamente, y por su gran disponibilidad e infinita paciencia. Gracias por vuestros consejos, experiencia e inestimable ayuda.

Agradecer a Cristian y a José Miguel toda la ayuda prestada y su disposición ante cualquier situación.

A todos mis compañeros de grupo. A las ya doctoras Conxín, Carme y Sandra y al doctor Julián. Gracias por compartir tan buenos momentos y por vuestra amistad. Y a mis actuales compañeros Raúl, Steven, Ana y Laura. Gracias por todos los momentos agradables que hemos compartido, por las risas y por los ánimos en la etapa final. Por supuesto agradecer a María, mi gran compañera de tesis, por su amistad y complicidad. Gracias a todos y cada uno de vosotros por vuestras aportaciones, sugerencias y por hacer que el día a día fuese más agradable. Sin vosotros este camino hubiese sido mucho más duro.

También quiero expresar mi agradecimiento a todos los estudiantes de grado y máster que han pasado por nuestros laboratorios y que tan buenos recuerdos han dejado, y en especial a Salva, por su carisma y buena energía, a Marina, por sus ganas de aprender, y a Ana, por su gran simpatía. También agradecer al resto de compañeros de departamento con los que he tenido el placer de compartir todos estos años.

También me gustaría agradecer a todos mis amigos, con quienes tan buenos momentos he vivido, por ser mi conexión con el mundo fuera de la universidad.

Finalmente, me gustaría agradecer a mis padres, a mi hermana Sonia y a mi hermano Vicente, por todo el apoyo, cariño y comprensión que me han dado en todo momento. Sin vuestra ayuda todo esto no hubiese sido posible. Gracias Vicente por el diseño de la portada y por todos los consejos.

A todos vosotros, gracias.

Abreviaturas y acrónimos

AcOEt = acetato de etilo	IC ₅₀ = concentración de compuesto capaz de inhibir al 50% la proliferación celular
ADN = ácido desoxirribonucleico	IUPAC = <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
ADP = difosfato de adenosina	lit. = literatura
ATP = trifosfato de adenosina	m = multiplete
ARN = ácido ribonucleico	MCF-7 = células de adenocarcinoma de mama
ARNm = ARN mensajero	MeOH = metanol
BAEC = células endoteliales de aorta de bovino	MIC = concentración mínima inhibitoria
bFGF = factor de crecimiento de fibroblastos básico	MMP = metaloproteinasas de la matriz extracelular
br = banda o señal ancha	MTT = bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Bu ₃ N = tri- <i>n</i> -butilamina	MW = microondas
cADN = ADN complementario	NAD ⁺ = nicotinamida adenina dinucleótido
calcd.= calculado	PBS = tampón de fosfato
d = doblete	PCR = <i>Polymerase Chain Reaction</i>
dd = doble doblete	PDGF = factor de crecimiento derivado de plaquetas
ddd = doble doble doblete	pf = punto de fusión
ddt = doble doble triplete	PIGF = factor de crecimiento placentario
dq = doble cuadruplete	qPCR = PCR a tiempo real
dt = doble triplete	quint = quintuplete
DME = 1,2-dimetoxietano	ROS = especies reactivas del oxígeno
DMEM = <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	RTK = proteínas transmembrana receptoras
DMF = <i>N,N</i> -dimetilformamida	s = singulete
DMSO = dimetilsulfóxido	sirt = sirtuinas
EGF = factor de crecimiento epidérmico	t = triplete
ELISA = <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	T = temperatura
Et ₃ N = trietilamina	t.a. = temperatura ambiente
EtOH = etanol	TBAB = bromuro de tetra- <i>n</i> -butilamonio
FBS = suero fetal bovino	<i>t</i> -BuOK = terc-butóxido de potasio
FGF = factor de crecimiento de fibroblastos	TERT= <i>Telomerase End Reverse Transcriptase</i>
GDP = bifosfato de guanosina	TGF-β = factor transformador de crecimiento beta
GTP = trifosfato de guanosina	THF = tetrahidrofurano
HEK-293 = células embrionarias de riñón	tt= triple triplete
HIF-1α = factor inducible de hipoxia	VEGF= factor de crecimiento endotelial vascular
hTERT = <i>human Telomeric End Reverse Transcriptase</i>	VEGFR = receptores del VEGF
hTR o TERC = <i>human Telomerase RNA</i>	VIH = virus de inmunodeficiencia humana
HT-29 = células de adenocarcinoma de colon	
HUVEC = células endoteliales de la vena del cordón umbilical	

Índice

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer	1
1.1. División celular	2
1.2. Apoptosis.....	5
1.3. Metástasis	6
2. Fármacos antitumorales	8
2.1. Resistencia a fármacos.....	10
3. Dianas biológicas	14
3.1. Tubulina.....	15
3.2. Protooncogenes.....	20
3.3. Telómeros y telomerasa.....	21
3.3.1. Telómeros	21
3.3.2. Telomerasa.....	28
3.3.3. Senescencia.....	32
3.3.4. Fármacos antitelomerasa	33
3.3.4.1. Inhibidores de hTERT	33
3.3.4.2. Inhibidores de hTR.....	34
3.3.4.3. Estabilizadores de la estructura G-cuadrupelex.....	35
3.3.4.4. Inmunoterapia.....	36
3.3.4.5. Terapia génica y viral	37
3.4. Angiogénesis.....	37
3.4.1. VEGF	41
3.4.2. Receptores de VEGF	44
3.4.3. Angiogénesis y cáncer.....	46
3.4.4. Fármacos antiangiogénicos.....	50
3.4.4.1. Inhibidores de quinasas	51
3.5. Sirtuinas.....	55
4. Acción antiangiogénica de los polifenoles vegetales.....	57
4.1. Resveratrol	60

4.1.1. Biodisponibilidad y metabolismo.....	65
4.1.2. Estudios SAR sobre el resveratrol	68

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo 1	71
2.2. Objetivo 2	75

CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE RESVERATROL

3.1. Síntesis de estirilfenoles, metoxi(estiril)bencenos y aliloxi(estiril)bencenos.....	77
3.1.1. Síntesis de estirilfenoles y metoxi(estiril)bencenos	79
3.1.2. Síntesis de aliloxi(estiril)bencenos	81
3.1.3. Síntesis de (hidroxiestiril)fenoles y (metoxiestiril)fenoles	82
3.2. Síntesis de estirilanilinas	84
3.2.1. Síntesis de estirilanilinas, (hidroxiestiril)anilinas y (metoxiestiril)anilinas	84
3.2.2. Síntesis de <i>N</i> -acil(estiril)anilinas	88
3.3. Síntesis de estirilpiridinas y estirilpirimidinas	89
3.3.1. Síntesis de 4-(hidroxiestiril), 4-(metoxiestiril) y 4-(aminoestiril)piridinas	89
3.3.2. Síntesis de (<i>E</i>)-1-(2-piridil)-2-(4-piridil)etileno, (<i>E</i>)-1-(3-piridil)-2-(4-piridil)etileno y (<i>E</i>)-1-(5-pirimidin)-2-(4-piridil)etileno	91
3.3.3. Síntesis de 2-(metoxiestiril) y 3-(metoxiestiril)piridinas.....	92
3.3.4. Síntesis de 2-(metoxiestiril) y 5-(metoxiestiril)pirimidinas.....	93
3.4. Síntesis de bencilidenanilinas	95
3.5. Experimental	100
3.5.1. Técnicas generales	100
3.5.2. Reacción de Heck	101
3.5.3. Reacción de Wittig	103
3.5.4. Reacción de alilación	103
3.5.5. Reacción de amidación.....	103
3.5.6. Síntesis de iminas.....	104
3.5.7. Datos espectroscópicos.....	105

CAPÍTULO 4. ENSAYOS BIOLÓGICOS DE LOS ANÁLOGOS DE RESVERATROL

4.1. Evaluación biológica de estililfenoles, metoxi(estiril)bencenos y aliloxi(estiril)bencenos	147
4.1.1. Citotoxicidad	147
4.1.2. Inhibición en la formación de tubos en células BAEC.....	150
4.1.3. Ensayo de inhibición de la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en células HT-29	154
4.1.4. Ensayo de inhibición de la expresión del gen <i>VEGF</i> en células HT-29...	157
4.2. Evaluación biológica de (hidroxiestiril)fenoles, (metoxiestiril)fenoles, estililanilinas y <i>N</i> -acil(estiril)anilinas.....	160
4.2.1. Citotoxicidad	160
4.2.2. Estudio de la inhibición de la proliferación celular	167
4.2.3. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF	168
4.2.4. Inhibición de la expresión génica de <i>VEGF</i>	170
4.2.5. Ensayo de migración celular con células BAEC	176
4.2.6. Inhibición de la expresión génica de <i>hTERT</i>	180
4.2.7. Inhibición de la expresión génica de <i>c-Myc</i>	182
4.2.8. Conclusiones	184
4.3. Evaluación biológica de estililpiridinas y estililpirimidinas.....	189
4.3.1. Citotoxicidad	189
4.3.2. Estudio de la inhibición de la proliferación celular	193
4.3.3. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF en células HT-29.....	194
4.3.4. Inhibición de la expresión génica de <i>VEGF</i> en células HT-29	195
4.3.5. Inhibición de la expresión génica de <i>hTERT</i> en células HT-29	196
4.3.6. Inhibición de la expresión génica de <i>c-Myc</i> en células HT-29.....	197
4.3.7. Conclusiones	198
4.4. Evaluación biológica de bencilidenanilinas	202
4.4.1. Citotoxicidad	202
4.4.2. Estudio de la inhibición de la proliferación celular	208
4.4.3. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF en células HT-29.....	208
4.4.4. Inhibición de la expresión génica de <i>VEGF</i> en células HT-29	209

4.4.5. Inhibición de la expresión génica de <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i> en células HT-29 .	210
4.4.6. Conclusiones	212
4.5. Evaluación biológica de sulfatos, acil y glucosilderivados de resveratrol.....	214
4.5.1. Citotoxicidad	215
4.5.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF en células HT-29	216
4.5.3. Inhibición de la expresión del gen <i>hTERT</i> en células HT-29.....	217
4.5.4. Inhibición de la expresión del gen <i>c-Myc</i> en células HT-29	218
4.5.5. Conclusiones	219
4.6. Experimental	221
4.6.1. Cultivos celulares	221
4.6.2. Ensayos de citotoxicidad	221
4.6.3. Ensayos de proliferación celular	222
4.6.4. Ensayo ELISA para la determinación de la producción de VEGF protéico secretado en el medio de cultivo.....	222
4.6.5. Determinación de la expresión génica de <i>VEGF</i> , <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i>	222
4.6.6. Ensayo de tubulogénesis sobre células BAEC.....	224
4.6.7. Ensayo de migración celular sobre células BAEC.....	224

CAPÍTULO 5. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE FURILIDENTIAZOLONAS Y FURILIDENTIOXOTIAZOLIDINONAS

5.1. Antecedentes bibliográficos.....	225
5.2. Síntesis de 5-furilidentiazolonas	228
5.3. Síntesis de 5-furilidentioxotiazolidinonas	228
5.4. Ensayos biológicos.....	231
5.4.1. Citotoxicidad	231
5.4.2. Estudio de la inhibición de la proliferación celular	234
5.4.3. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF en células HT-29	235
5.4.4. Inhibición de la expresión génica de <i>VEGF</i> en células HT-29.....	236
5.4.5. Inhibición de la expresión génica de <i>hTERT</i> en células HT-29	237
5.4.6. Inhibición de la expresión génica de <i>c-Myc</i> en células HT-29	237
5.5. Conclusiones	239

5.6. Experimental	240
5.6.1. Procedimientos sintéticos.....	240
5.6.2. Ensayos biológicos.....	241

CHAPTER 6. SUMMARY

6.1. Introduction.....	243
6.1.1. Protooncogenes	244
6.1.2. Telomeres and telomerase	244
6.1.3. Angiogenesis	246
6.1.4. Sirtuins	247
6.1.5. Resveratrol	248
6.2. Aims and objectives	251
6.3. Styrylphenols, methoxy(styryl)benzenes and allyloxy(styryl)benzenes	252
6.4. (Hydroxystyryl)phenols, (methoxystyryl)phenols, styrylanilines and <i>N</i> -acyl-styrylanilines.....	254
6.5. Styrylpyridines and styrylpyrimidines.....	259
6.6. Benzylidenanilines	262
6.7. Sulphate, acyl and glucosyl resveratrol derivatives.....	264
6.8. Furylidenthiazolone and furylidenthioxothiazolidinone derivatives	266

CAPÍTULO 7. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA TESIS

7.1. Comunicaciones a congresos	269
7.2. Publicaciones	270

CAPÍTULO 8. ESPECTROS SELECCIONADOS

8. Espectros seleccionados	279
----------------------------------	-----

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

La química médica es una ciencia altamente interdisciplinar que combina, entre otras, la química orgánica, la bioquímica, la química física y computacional, la farmacología y la biología molecular. Su objetivo es el diseño, síntesis y estudio químico y biológico de nuevas moléculas con potenciales actividades farmacológicas y/o terapéuticas.

Según la IUPAC (1970), la química medicinal “es una disciplina científica que se ocupa del diseño, síntesis, identificación, evaluación e interpretación a nivel molecular del modo de acción de nuevos compuestos biológicamente activos, estableciendo relaciones entre la estructura química y la actividad farmacológica”.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados, siendo una de las enfermedades que más preocupación despierta en la sociedad actual, por lo que resulta de vital importancia la búsqueda de nuevos fármacos y nuevas dianas biológicas que permitan atacar al cáncer de manera más selectiva y eficaz. Por ello, uno de los focos de actuación de la química médica es el campo de los fármacos antitumorales.

El cáncer no es una enfermedad unitaria sino un amplio y complejo grupo de enfermedades relacionadas (más de 100 tipos descritos) cuyo único elemento común es la proliferación descontrolada y subsiguiente dispersión de células aberrantes mutadas a partir de un punto u órgano de origen. Dada la complejidad del proceso canceroso a nivel bioquímico y la variedad de etiologías, no existe un único tipo de compuesto que pueda ejercer una acción curativa en todos los casos. Se entiende, por tanto, que la actuación contra el fenómeno canceroso requiere un enfoque múltiple con un conocimiento preciso del mismo a nivel molecular.¹ Muchos fármacos antitumorales ejercen su acción sobre proteínas de las células cancerosas no presentes en las células normales o presentes en bajas concentraciones con el fin de minimizar los posibles efectos secundarios.²

Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los tumores benignos son aquellos que crecen de manera lenta y ordenada, no destruyen células normales y no sufren metástasis, por lo que son controlables y se pueden eliminar fácilmente mediante

¹ (a) Boyle, F. T.; Costello, G. F. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 251-261. (b) Gibbs, J. B. *Science* **2000**, 287, 1969-1973.

² Drahl, C.; Cravatt, B. F.; Sorensen, E. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5788-5809.

cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. Por el contrario, los tumores malignos son aquellos que resultan muy agresivos e invasivos, con crecimiento rápido y descontrolado siendo, consecuentemente, difíciles de dominar y erradicar.^{3,4}

Según la teoría monoclonal del cáncer, generalmente aceptada en la actualidad, el tumor maligno tiene su origen en una única célula mutada, en la cual la suma de múltiples mutaciones provoca su transformación en un fenotipo maligno y, finalmente, en un tumor canceroso.

1.1. División celular

El ciclo celular está formado por una serie de etapas en las que una célula madre duplica su material genético y se divide en dos células hijas. El proceso está formado por dos etapas claramente diferenciadas: una en la cual la célula se encuentra en estado de no división o interfase y otra, conocida como fase M o mitosis, en la cual la célula se divide en dos células hijas con igual material genético (véase la figura 1.1).

Durante la interfase, la célula crece y duplica su material genético. La interfase está, a su vez, formada por las etapas G_1 , S y G_2 .

La fase G_1 (del inglés *Growth* o *Gap* 1) es la de crecimiento activo del citoplasma. En ella tiene lugar la síntesis de proteínas y de ARN. Tiene una duración de entre 6 y 12 horas y en esta fase la célula duplica el tamaño y masa celular debido a la continua síntesis de sus componentes, incluyendo la producción de orgánulos.

Después de la fase G_1 tiene lugar la fase S (del inglés *Synthesis*) donde tiene lugar la síntesis de ADN. En esta fase cada cromosoma se duplica, quedando formado por dos cromátidas idénticas. Como resultado, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al inicio de la fase. Tiene una duración de unas 10-12 horas, que es, aproximadamente, la mitad de la duración de todo el ciclo celular.

Seguidamente la célula entra en fase G_2 (del inglés *Growth* o *Gap* 2) en la que se continúa la síntesis de proteínas y de ARN necesarios para la división celular. Tiene una duración de entre 3 y 4 horas y termina cuando la cromatina empieza a condensarse iniciando la mitosis. Al finalizar la fase G_2 el material genético ya se encuentra totalmente duplicado.

³ Asociación Española Contra el Cáncer; www.aecc.es

⁴ Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. 2004, www.cancer.gov.co

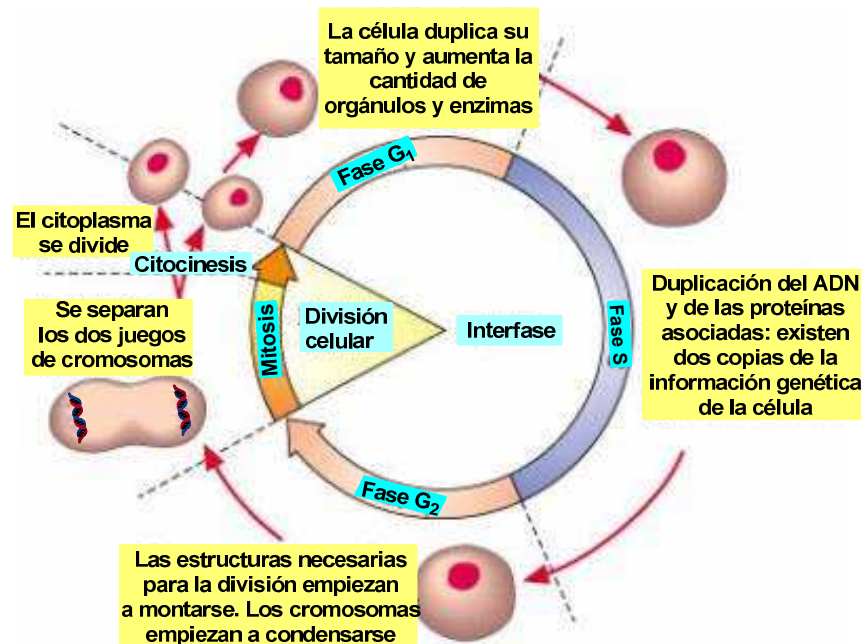


Figura 1.1. Representación del ciclo celular.

En resumen, la interfase es la etapa previa a la división celular propiamente dicha en la que la célula se prepara para la mitosis. En la interfase los cromosomas no están claramente diferenciados, aunque ya se observa la presencia del nucléolo y los centriolos, que servirán para la organización del huso mitótico.

Finalmente, la célula entra en fase M donde tiene lugar la división celular propiamente dicha. La fase comprende dos procesos acoplados: la mitosis, en la que tiene lugar el reparto de material genético de manera igualitaria, y la citocinesis, que es el proceso de división física del citoplasma que da lugar a dos células hijas idénticas. A su vez, la mitosis consta de varias etapas: profase, metafase, anafase y telofase.

En la profase (véase la figura 1.2) la cromatina se condensa en el núcleo para formar los cromosomas, cada uno formado por dos cromátidas unidas por el centrómero. La membrana nuclear se fracciona y los nucléolos desaparecen, dispersándose en el citoplasma en forma de ribosomas. Los centriolos comienzan a moverse hacia los polos de la célula.

En la prometafase, o metafase temprana, la membrana nuclear está completamente rota. Las proteínas se unen a los centrómeros formando los

cinetocoros. Los microtúbulos se unen a los cinetocoros, de modo que los cromosomas quedan unidos a los microtúbulos permitiendo su posterior desplazamiento.

En la metafase tardía aparece el huso mitótico, formado por haces de microtúbulos. En este momento los cromosomas muestran la máxima condensación y son fácilmente desplazados por los microtúbulos hasta que todos los centrómeros quedan en el plano ecuatorial. Esta organización asegura que, en el proceso de separación de los cromosomas, cada núcleo reciba una copia de cada cromosoma. La metafase termina con la duplicación del ADN del centrómero.

En la anafase se produce la separación de los centrómeros. Los pares de cromosomas se separan de los cinetocoros y cada juego de cromosomas migra hacia un polo atraído por los microtúbulos, formando dos núcleos.

En la telofase los cromosomas llegan a los polos de la célula y se forman nuevas membranas alrededor de los núcleos hijos, los cuales adoptan una estructura menos densa. Las fibras del huso mitótico se dispersan.

Finalmente, en la citocinesis se divide la célula formándose las dos células hijas, cada una con un completo juego de cromosomas. La separación se produce cuando un anillo de actina se contrae alrededor del núcleo celular, dejando la célula dividida en dos células hijas, cada una con un núcleo.

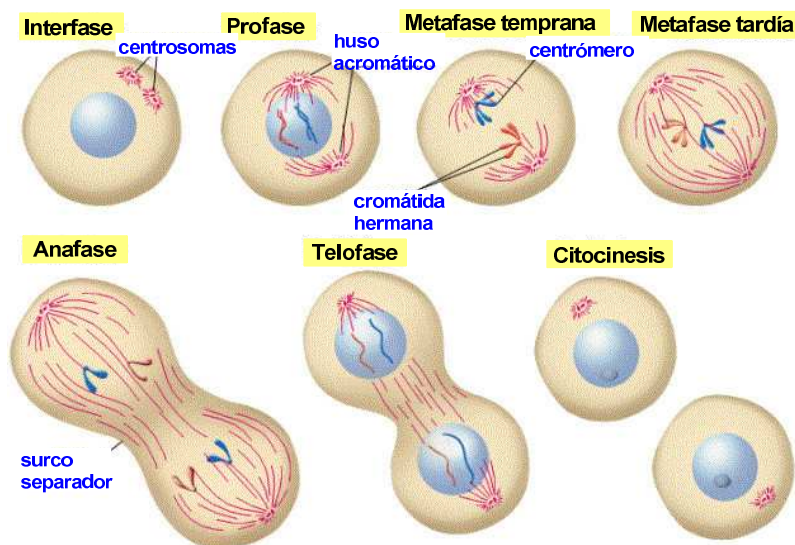


Figura 1.2. Representación de la fase M (mitosis).

Una vez terminada la división celular, las células pueden entrar nuevamente en fase G_1 y comenzar un nuevo ciclo de división celular, pueden perder su capacidad reproductora y sufrir el proceso de diferenciación, o pueden entrar en fase G_0 . La fase G_0 es aquella en la que las células entran en reposo proliferativo permanente y es conocida con el nombre de quiescencia, aunque en determinadas ocasiones, las células en fase G_0 pueden pasar a la fase G_1 .

El ciclo celular regula la proliferación celular mediante las fases G_1/S y G_2/M . Sin embargo, en células mutadas, como es el caso de las células tumorales, esta regulación es deficiente, por lo que las células crecen y se dividen sin control.

1.2. Apoptosis

Mediante la apoptosis, o muerte celular programada, las células sanas se dividen de manera controlada y mueren al cabo de un número determinado de divisiones. El proceso de apoptosis también se activa cuando una célula sana sufre mutaciones no reparables. Sin embargo, en las células tumorales la apoptosis se encuentra desactivada, por lo que las células crecen y se dividen sin control y de manera casi infinita, fenómeno que se conoce como la inmortalidad del cáncer (véase la figura 1.3).

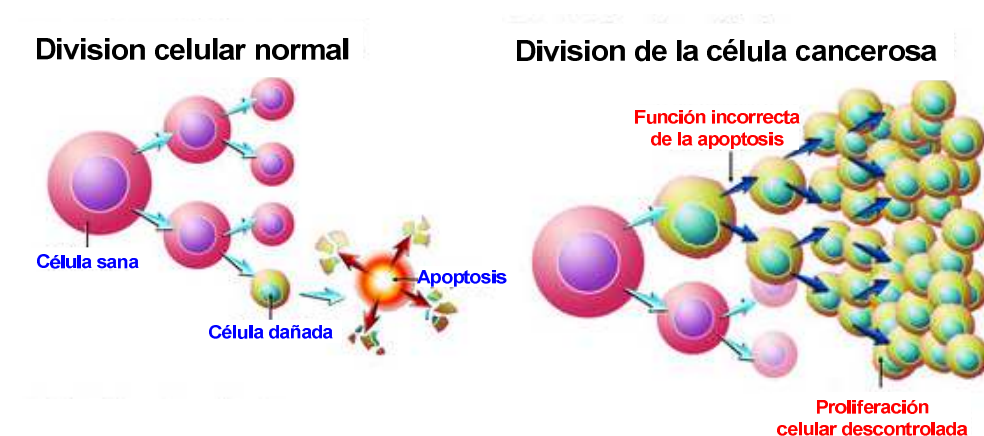


Figura 1.3. Representación de la división celular en una célula sana y en una célula cancerosa.

La apoptosis es un mecanismo genéticamente predeterminado regulado por rutas intrínsecas y extrínsecas. En las vías extrínsecas la apoptosis se desencadena mediante la activación de receptores presentes en la superficie celular. Estos

receptores se activan por mediación de la caspasa-8, la cual se propaga por acción de las caspasas 3, 6 y 7.⁵ La vía intrínseca o mitocondrial se presenta cuando hay un aumento de citocromo c libre, el cual produce un aumento de apoptosoma (proteína cuaternaria formada en el proceso de apoptosis) que conlleva una activación de la caspasa-9 y consecuentemente activa las caspasas 3, 6 y 7, dando lugar en última instancia al fenómeno de apoptosis.⁶ Ciertos estudios revelan que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son inductoras de la apoptosis en la vía intrínseca.⁷

Una vez se ha iniciado la apoptosis, las caspasas se unen a diversas proteínas celulares produciendo cambios morfológicos característicos en el proceso de apoptosis, como la desintegración de la membrana plasmática.⁸

1.3. Metástasis

En términos generales la metástasis se refiere a la transferencia de una enfermedad o proceso patológico desde un órgano o sector a otro no directamente conectado con el primero. La metástasis tumoral es la extensión discontinua de un tumor a una zona más o menos alejada de la neoplasia primaria, formándose un tumor secundario cuyas células parenquimatosas son semejantes a las del tumor de origen y no a las del órgano en que se asienta la metástasis. Según el medio de transporte de las células tumorales se reconocen tres tipos principales de metástasis: las linfógenas, en las que la diseminación de células tiene lugar mediante vía linfática, las hematógenas, en las que las células se diseminan mediante vía sanguínea, y las transcelómicas, en las que la diseminación celular produce a través del líquido de una cavidad serosa o del líquido cefalorraquídeo.

Para que tenga lugar la metástasis resulta clave la activación de la angiogénesis y la degradación de la matriz extracelular.^{9,10,11} Estos procesos están regulados por varios estimuladores tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF),¹² el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),¹³ las angiopoyetinas,¹⁴ los

⁵ Degterev, A.; Yuan, J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 378-390.

⁶ Letai, A. G. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 121-132.

⁷ Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Brenner, C. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 99-163.

⁸ Watson, A. J. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2006**, *57*, 107-121.

⁹ Bishop, J. M. *Cell* **1991**, *64*, 235-241.

¹⁰ Cohen, P. L.; Ellwein, L. B. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6493-6505.

¹¹ Weinberg, R. A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *758*, 331-338.

¹² Nugent, M. A.; Iozzo, R. V. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, *32*, 115-120.

¹³ Petrova, T. V.; Makinen, T.; Alitalo, K. *Exp. Cell Res.* **1999**, *253*, 117-130.

activadores de las integrinas¹⁵ y por inhibidores tales como la trombospondina,¹⁶ la angiostatina¹⁷ y la endostatina.¹⁸ En algunos casos, la interacción entre las células tumorales y los componentes de la matriz extracelular está influenciada por factores de crecimiento presentes en el medio.¹⁹

Las células poseen en su superficie unas moléculas de adhesión que les permiten unirse a células iguales. Asimismo, estas moléculas les permiten unirse a la matriz extracelular, la cual está constituida por una red de proteínas insolubles que rellenan los espacios intersticiales entre las células y las mantienen unidas entre sí, evitando que éstas puedan quedar libres y migrar a otras partes del cuerpo. Si una célula pierde la capacidad de adhesión a las células de su entorno se desencadena el proceso de apoptosis celular. Si, a pesar de todo, la célula consigue penetrar en el torrente sanguíneo, el sistema inmunitario la detecta y la destruye para evitar que pueda establecerse en otra parte del organismo. Las células tumorales consiguen evitar estos dos sistemas de control. Así, por un lado, las células tumorales tienen disminuida su capacidad de adhesión a las células del entorno y a la matriz extracelular, destruyéndola mediante la sobreexpresión y segregación de enzimas denominadas MMPs (metaloproteinasas de la matriz extracelular). Por otro lado, la acción de las MMPs facilita la entrada de las células tumorales en el torrente sanguíneo al destruir la matriz extracelular de las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

Otra consecuencia de la pérdida de moléculas de adhesión de las células tumorales es que éstas pierden su diferenciación y el sistema inmunitario no las puede detectar y destruir. Sin embargo, a pesar de no ser detectadas por el sistema inmunitario, se calcula que solo 1 de cada 10.000 células cancerosas que penetran en el torrente sanguíneo llega a generar un tumor secundario.

¹⁴ Davis, S.; Aldrich, T. H.; Jones, P. F.; Acheson, A.; Compton, D. L.; Jain, V.; Ryan, T. E.; Bruno, J.; Radziejewski, C.; Maisonpierre, P. C.; Yancopoulos, G. D. *Cell* **1996**, *87*, 1161-1169.

¹⁵ Eliceiri, B. P.; Cheres, D. A. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 1227-1230.

¹⁶ Roberts, D. D. *FASEB J.* **1996**, *10*, 1183-1191.

¹⁷ O'Reilly, M. S.; Holmgren, L.; Shing, Y.; Chen, C.; Rosenthal, R. A.; Moses, M.; Lane, W. S.; Cao, Y. H.; Sahge, E. H.; Folkman, J. *Cell* **1994**, *79*, 315-328.

¹⁸ O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R.; Folkman, J. *Cell* **1997**, *88*, 277-285.

¹⁹ Fidler, I. J.; Radinsky, R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 166-168.

El proceso de metástasis consiste en una serie secuencial de pasos interrelacionados que se describen a continuación:²⁰

- a) Transformación de células normales en células tumorales, seguida de crecimiento tumoral. Esta etapa depende del aporte de nutrientes mediante difusión.
- b) Vascularización extensiva o angiogénesis. Este proceso tiene lugar cuando el tamaño del tumor es de más de 1 mm de diámetro.
- c) Invasión local mediante mecanismos que implican a las vénulas de pared fina, las arteriolas fragmentadas y los canales linfáticos, que presentan poca resistencia frente a la invasión.
- d) Separación y embolización.²¹ Las células que sobreviven en el torrente sanguíneo se unen a los capilares de otros órganos adhiriéndose a los capilares de las células endoteliales o a las membranas basales subendoteliales.
- e) Extravasación en nuevos órganos o tejidos.
- f) Proliferación en los nuevos órganos o tejidos. El nuevo tumor secundario formado debe evadir las defensas del órgano invadido.

2. Fármacos antitumorales

Actualmente existen cuatro principales vías de actuación para atacar al cáncer: cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia biológica dirigida. El objetivo último de todas ellas es la exterminación de todas las células cancerosas del organismo.

En la quimioterapia se ataca el tumor mediante la utilización de agentes antineoplásicos, ya sea matando a las células (fármacos citotóxicos) o ya sea impidiendo que éstas continúen dividiéndose (fármacos antitumorales). Muchos agentes antineoplásicos actúan durante un determinado ciclo de la división celular, por lo que se denominan como ciclo-específicos, mientras que otros afectan a la célula durante todo su ciclo de desarrollo, por lo que son denominados como ciclo-inespecíficos. La variedad de agentes antineoplásicos es muy grande. En la figura 1.4

²⁰ Yance, D. R.; Sagar, S. M. *Integr. Cancer Ther.* **2006**, 5, 9-29.

²¹ El término embolización se refiere a la oclusión de un vaso mediante la introducción en el torrente sanguíneo de un cuerpo extraño o tejido biológico, lo que provoca la interrupción del flujo vascular mecánicamente o mediante la producción de una intensa reacción inflamatoria de la pared.

se muestra la diversidad de compuestos existentes, con los diferentes niveles de actuación que presentan.

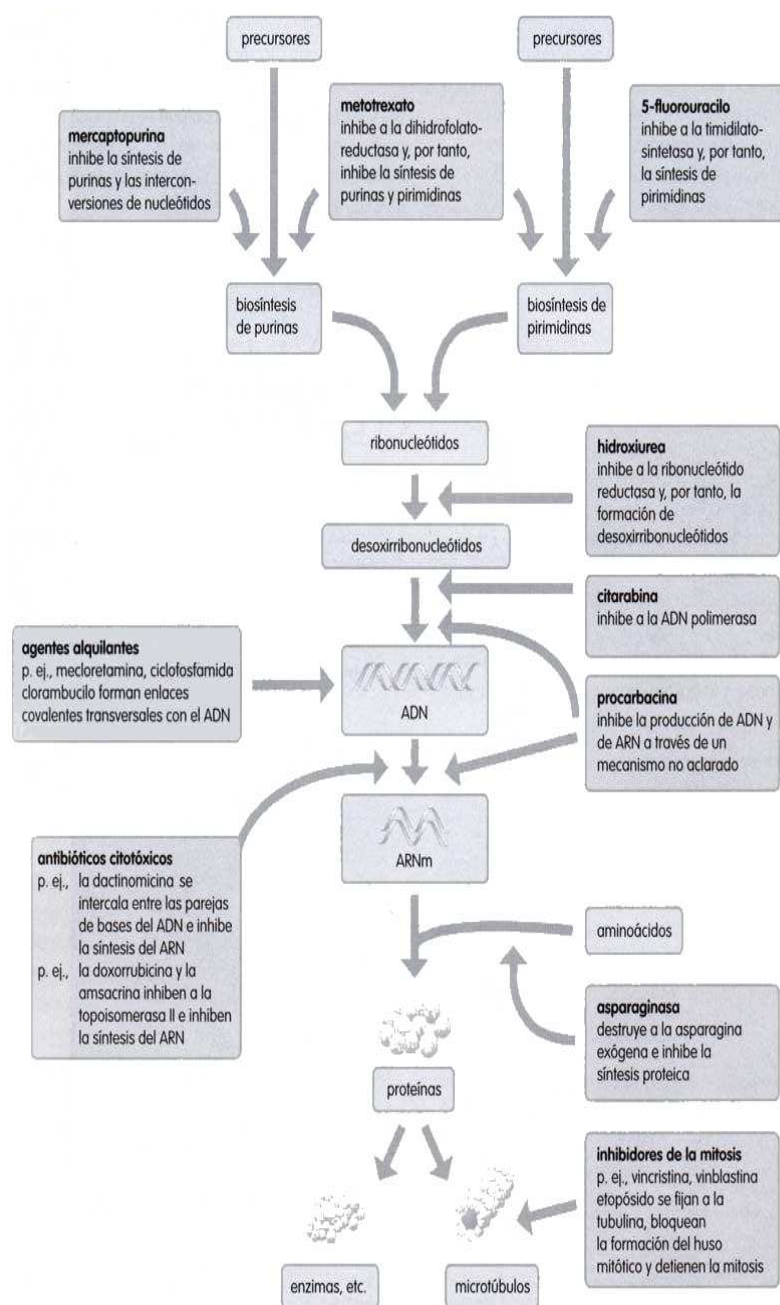


Figura 1.4. Esquema de los diferentes niveles de actuación de los fármacos antineoplásicos.

La radioterapia emplea radiaciones ionizantes con el fin de exterminar a las células tumorales o paliar los síntomas del paciente. Habitualmente se utilizan rayos X, γ o partículas α . Al igual que la quimioterapia, la radioterapia es altamente inespecífica, pues actúa sobre todas las células que son irradiadas.

La terapia biológica dirigida es una terapia mucho más específica que se basa en el empleo de fármacos u otras sustancias que interfieren con moléculas específicas que participan en el crecimiento y proliferación de las células tumorales y que no se encuentran presentes en las células sanas o lo hacen en muy bajas proporciones. Dentro de este tipo de terapia se encuentra la inmunoterapia, las terapias hormonales, los inhibidores de transducción de señal, los moduladores de la expresión de genes, los inhibidores de la angiogénesis, los anticuerpos monoclonales, las vacunas contra el cáncer y la terapia génica.²²

2.1. Resistencia a fármacos

Uno de los mayores problemas que presenta la quimioterapia es su alta inespecificidad. Así, muchos agentes antineoplásicos atacan a las células tumorales y también a las células sanas que se caracterizan por una alta tasa de división, como las de la médula ósea, el tracto digestivo o el folículo piloso. Otro de los inconvenientes de la quimioterapia es el desarrollado de resistencia. Los mecanismos implicados en la resistencia son varios. Uno de ellos implica la disminución de la absorción del fármaco por la célula o el aumento de la biosíntesis de la diana contra la que el fármaco se dirige. En el caso de los profármacos, otra vía de resistencia puede ser la inhibición de la reacción que conlleva a la formación del fármaco.

Un mecanismo muy común en el proceso de resistencia adquirida es la expulsión del fármaco del interior al exterior de la célula mediante la intervención de la glicoproteína P, que está presente en las paredes del intestino y en la barrera hematoencefálica y actúa como una bomba de ATP que elimina toxinas de las células sanas. En las células cancerosas la glicoproteína P está mutada, provocando la extracción del interior de las células de ciertos fármacos que funcionan como sustratos de ésta. En el mecanismo de acción se produce la hidrólisis de una molécula de ATP en una de ADP, lo que provoca un cambio conformacional en la glicoproteína P que permite la expulsión del fármaco al exterior de la célula. En la figura 1.5 se representa la acción de la glicoproteína P ante la presencia de un fármaco.

²² Instituto Nacional del Cáncer; www.cancer.gov

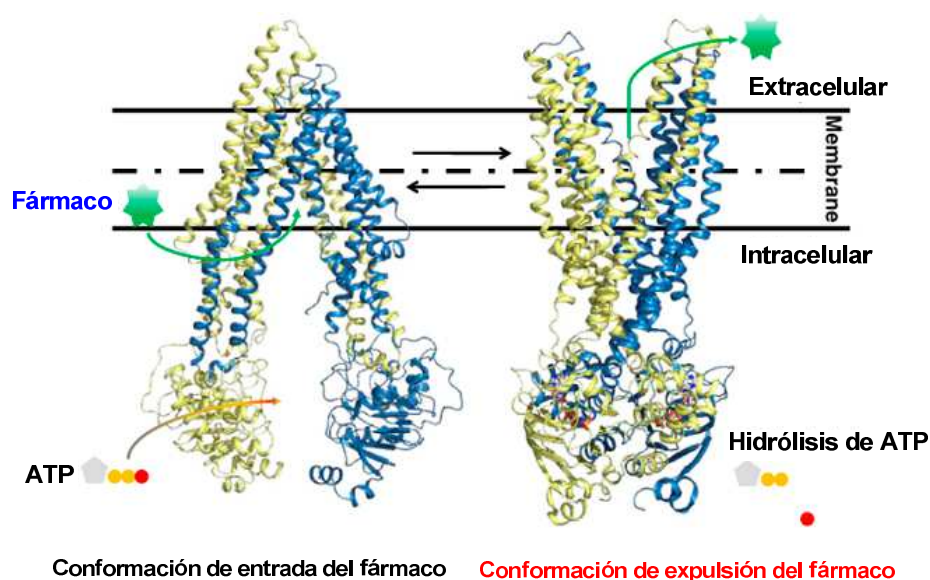


Figura 1.5. Representación del modo de acción de la glicoproteína P.

La glicoproteína P está sobreexpresada en determinados tipos de tratamientos, convirtiendo a las células cancerosas en resistentes a una amplia variedad de fármacos, incluso a aquellos a los que la célula no ha estado nunca expuesta. Este fenómeno se conoce como multirresistencia a fármacos (MDR, del inglés *Multi Drug Resistance*).²³

Para inhibir el proceso de resistencia se han desarrollado ciertos fármacos que compiten con los antitumorales por el sitio de unión de la glicoproteína P (véase la figura 1.6). Uno de estos inhibidores es el verapamilo, un bloqueador del canal de calcio que compete de manera eficaz por la glicoproteína P y evita la expulsión del

²³ (a) Zaman, G. J. R.; Flens, M. J.; van Leusden, M. R.; Haas, M.; Mulder, H. S.; Lankelma, J.; Pinedo, H. M.; Scheper, R. J.; Baas, F.; Broxterman, H. J.; Borst, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8822-8826. (b) Sharma, S.; Piwnica-Worms, D. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2545-2560. (c) Rottenberg, S.; Nygren, A. O. H.; Pajic, M.; van Leeuwen, F. W. B.; van der Heijden, I.; van de Wetering, K.; Liu, X.; de Visser, K. E.; Gilhuijs, K. G.; van Tellingen, O.; Schouten, J. P.; Jonkers, J.; Borst, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12117-12122. (d) Zhou, S. F.; Wang, L. L.; Di, Y. M.; Xue, C. C.; Duan, W.; Li, C. G.; Li, Y. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1981-2039. (e) Hembruff, S. L.; Laberge, M. L.; Villeneuve, D. J.; Guo, B.; Veitch, Z.; Cecchetto, M.; Parissenti, A. M. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 318. (f) Perez, E. A. *Breast Cancer Res. Tr.* **2009**, *114*, 195-201. (g) Hopper-Borge, E.; Xu, X.; Shen, T.; Shi, Z.; Chen, Z. S.; Kruh, G. D. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 178-184. (h) Liu, F. S. *Taiwan J. Obstet. Gyne.* **2009**, *48*, 239-244.

fármaco antitumoral.²⁴ También se ha demostrado que en presencia de verapamilo, las células P388/VCR pierden la resistencia adquirida a la vincristina (alcaloide antitumoral usado en el tratamiento de la leucemia aguda).²⁵ Otros agentes como la ciclosporina A, la quinina, el laniquidar, el zosuquidar o el tariquidar también presentan capacidad de inhibir la glicoproteína P.²⁶ Sin embargo, la mayor dificultad en la aplicación de este tipo de compuestos reside en su falta de selectividad, que muy a menudo altera el funcionamiento de las células sanas.

Otra estrategia para evitar la MDR es el uso de agentes citotóxicos que sean capaces de evadir la glicoproteína P, como por ejemplo la anamicina y la idarrubicina, que son análogos lipofílicos de antraciclina (véase la figura 1.6).²⁶

Una tercera estrategia para evitar la MDR utiliza la hipersensibilidad de algunas células hacia ciertos compuestos como el 5-fluorouracilo (véase la figura 1.6). Este compuesto es capaz de inducir apoptosis en mayor proporción sobre células KB-A1 resistentes a fármacos que en las células no resistentes o sensibles KB-3-1.²⁷

Una última forma de evadir la resistencia a fármacos consiste en el empleo de compuestos que interaccionen de manera irreversible con la diana terapéutica mediante enlaces covalentes. De este modo se consigue un equilibrio desplazado hacia la unión fármaco-diana y por tanto, una baja concentración de fármaco libre susceptible de ser expulsado.

Además de la glicoproteína P, la proteína asociada a la multiresistencia MRP (del inglés *Multidrug Resistance-associated Protein*) también juega un papel importante en la resistencia a fármacos. Esta proteína también actúa como transportadora de membrana, expulsando fuera de la célula agentes lipofílicos antineoplásicos.²⁸

²⁴ Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, G.; Gottesman, M. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *5*, 219-234.

²⁵ Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 1967-1972.

²⁶ Byrne, J. L.; Dasgupta, E.; Pallis, M.; Turzanski, J.; Forman, K.; Mitchell, D.; Haynes, A. P.; Russell, N. H. *Leukemia* **1999**, *13*, 786-791.

²⁷ Warr, J. R.; Bamford, A.; Quinn, D. M. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 39-44.

²⁸ Cascales-Angosto, M. Monografía VIII. Proliferación celular y cáncer 2000. Mecanismos moleculares de la multiresistencia.

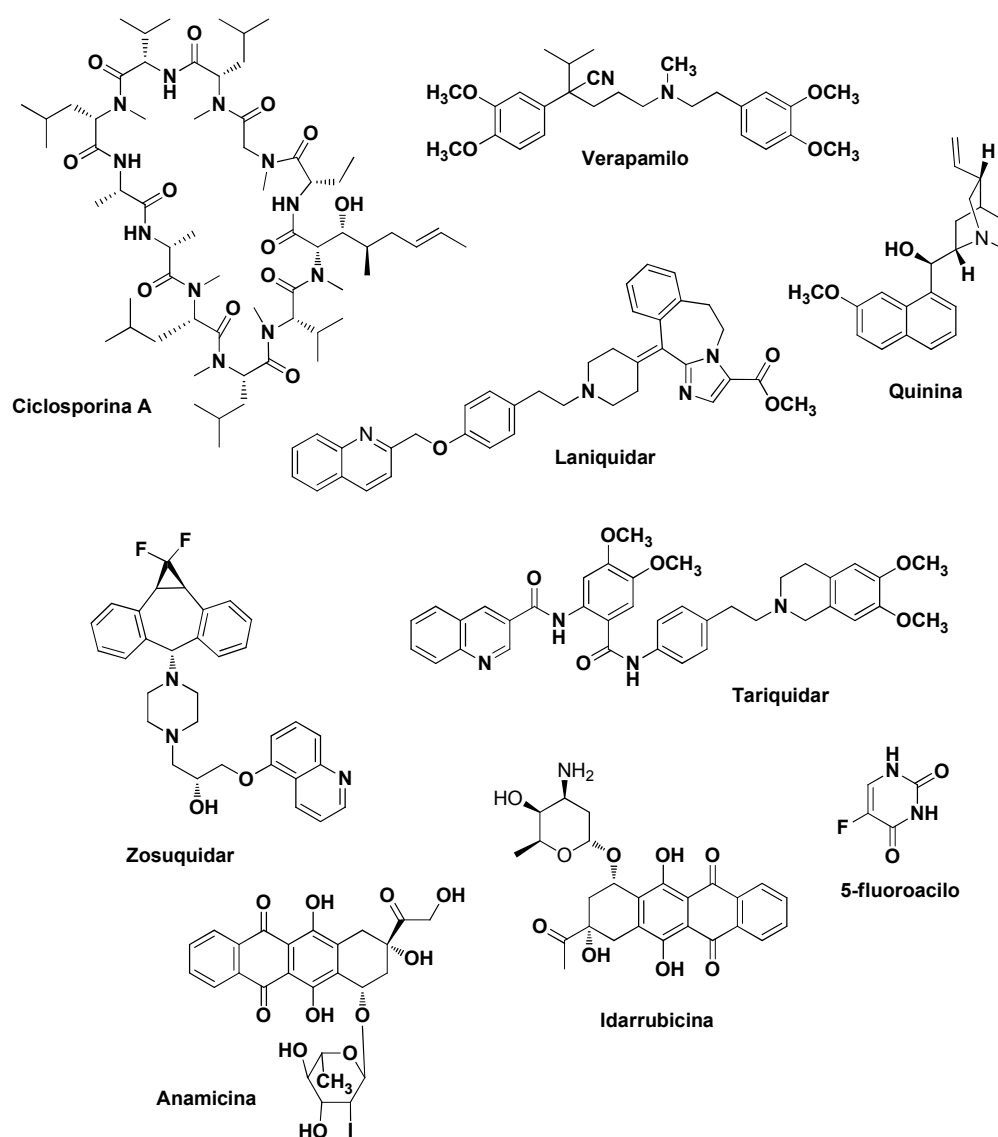


Figura 1.6. Fármacos empleados en MDR.

3. Dianas biológicas

Una diana biológica es una biomolécula que desempeña una función esencial en una enfermedad. Se calcula que hoy en día existen unas 8.000 dianas biológicas conocidas. Estas dianas pueden ser factores secretados, receptores de la superficie celular, canales iónicos o proteínas implicadas en la vías de señalización intracelular. El diseño racional de nuevos fármacos requiere del conocimiento de estas dianas biológicas y del sitio de unión del fármaco a su diana, aunque en la actualidad aún es relativamente bajo el número de fármacos cuyo diseño se haya hecho en función de la estructura de su diana biológica.²⁹

La unión fármaco-diana resulta tanto más fuerte cuanto más fuerte sea la interacción entre ambos, de lo que cabría deducir que los fármacos unidos a su diana mediante enlaces covalentes deberían ser los de mayor potencia terapéutica. Sin embargo, la mayoría de los fármacos interactúan con su diana mediante fuerzas intermoleculares más o menos débiles, como las que ejercen las interacciones electrostáticas, los enlaces de hidrógeno, las interacciones de tipo van der Waals, las interacciones dipolo-dipolo o las interacciones hidrofóbicas.³⁰

En el caso del cáncer, un buen fármaco antitumoral sería aquel capaz de atacar muy selectivamente a las células tumorales, lo que se podría conseguir eligiendo como dianas biológicas aquellas biomoléculas no presentes en células sanas o presentes en una muy baja proporción.

Hanahan y Weinberg publicaron en el año 2000 un artículo titulado *The Hallmarks of Cancer*,³¹ en el que proponían seis características comunes de las células cancerosas. Estas características fueron ampliadas con otras cuatro adicionales en un artículo publicado por estos dos autores en el año 2011.³² Las diez características comunes a las células cancerosas son las siguientes:

- 1) Desregulación de los factores de crecimiento que provocan autoestimulación del crecimiento.
- 2) Resistencia a las señales de parada del crecimiento.
- 3) Resistencia a la apoptosis.
- 4) Capacidad de inducción de la angiogénesis.

²⁹ López-Pérez, J. L.; Olmo-Fernández, E.; San Feliciano, A. *Enf. Emerg.* **2005**, *7*, 52-56.

³⁰ Patrick, G. L. *An introduction to Medicinal Chemistry*. 4th Edition, **2009**.

³¹ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

³² Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.

- 5) Capacidad replicativa ilimitada.
- 6) Capacidad de invasión de los tejidos circundantes y metástasis.
- 7) Desregulación del metabolismo.
- 8) Capacidad de evasión al sistema inmunitario.
- 9) Anormalidades cromosómicas que provocan inestabilidad del ADN.
- 10) Inflamaciones crónicas locales.

Como se deduce del listado anterior, las células cancerosas se caracterizan, entre otras, por una capacidad replicativa ilimitada, por la inducción de la angiogénesis y por la resistencia a la apoptosis, razón por la cual muchos antitumorales tienen como dianas biológicas la tubulina (proteína que forma el huso mitótico), proteínas y receptores relacionados con la angiogénesis³³ y protooncogenes y proteínas que regulan la acción de la telomerasa.³⁴

3.1. Tubulina

Muchos fármacos anticáncer ejercen su modo de acción en el proceso de formación y disrupción de los microtúbulos. Estos biopolímeros están constituidos por una proteína heterodimérica denominada tubulina, formada por una subunidad α y una β . Ambas subunidades comparten el 40% de identidad de secuencia (unos 450 aminoácidos) y sus estructuras tridimensionales son muy similares (véase la figura 1.7).³⁵ La diferencia más llamativa entre ambas subunidades reside en el bucle S9-S10, que en la subunidad α contiene 8 aminoácidos más que en la subunidad β . Ambas subunidades llevan asociadas una molécula de GTP (dos por heterodímero α/β), de las cuales la asociada al monómero α está unida de manera fija y no es intercambiable (sitio N). En cambio, la unida al monómero β es fácilmente intercambiable y susceptible a la hidrólisis y está directamente implicada en la unión entre las mitades monoméricas y en el proceso de polimerización (sitio E).

³³ (a) Sagar, S. M.; Yance, D.; Wong, R. K. *Curr. Oncol.* **2006**, *13*, 14-26. (b) Sagar, S. M.; Yance, D.; Wong, R. K. *Curr. Oncol.* **2006**, *13*, 99-107.

³⁴ (a) Harley, C. B. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 167-177. (b) McCarthy, N. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 164-165.

³⁵ Nogales, E.; Wolf, S. G.; Downing, K. H. *Nature* **1998**, *391*, 199-203.

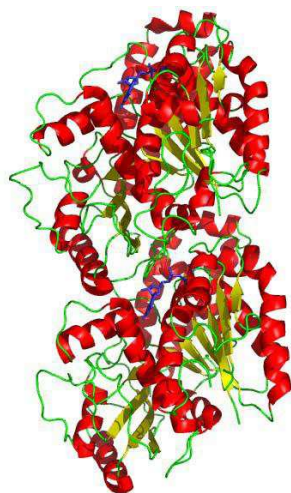


Figura 1.7. Estructura tridimensional del dímero de tubulina. Las subunidades α y β se encuentran unidas a GTPs, que se representan en color azul. Las cadenas beta se representan en color amarillo y las hélices alfa en color rojo.

Los dímeros de tubulina forman unos heterodímeros cuya polimerización conduce progresivamente a la formación de unos protofilamentos, la unión de los cuales genera finalmente los microtúbulos. El microtúbulo exhibe dos extremos diferenciados, denominados (+) y (–), de los que el primero, que termina con una capa de subunidades β unidas a una “tapadera” de moléculas de GTP (*GTP cap*), es el más activo en el proceso de ensamblaje y desensamblaje, mientras que el segundo, que contiene subunidades α sin la tapadera de moléculas de GTP, es mucho menos activo y está además unido a unas proteínas denominadas proteínas organizadoras de los microtúbulos.³⁶

Al irse formando los protofilamentos, la hidrólisis de GTP a GDP y P_i , fenómeno que ocurre en el llamado extremo (+) de los mismos, facilita el proceso de polimerización. En la formación del microtúbulo, las dos subunidades α y β se unen primero longitudinalmente cabeza con cola dando lugar a los protofilamentos. Un grupo de éstos (alrededor de trece, generalmente) se unen luego lateralmente para generar la pared del microtúbulo.

³⁶ (a) Nogales, E.; Wang, H.-W. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 179-184. (b) Nogales, E.; Wang, H.-W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 221-229.

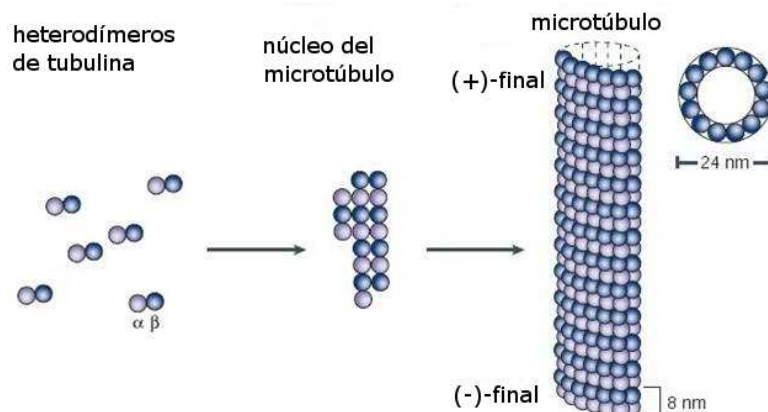


Figura 1.8. Polimerización de los microtúbulos. Los heterodímeros de α -tubulina y β -tubulina se unen dando un núcleo corto inicial que experimenta a continuación un alargamiento por los dos extremos. Cada microtúbulo tiene un extremo (+), ocupado por β -tubulina, y un extremo (-), ocupado por α -tubulina.

Las figuras 1.8 y 1.9 muestran la dinámica de los equilibrios de polimerización y despolimerización, conocidos con la expresión “inestabilidad dinámica” de los microtúbulos, y el papel que juega en el mismo la hidrólisis del GTP. Se ha propuesto que un residuo de ácido glutámico de la α -tubulina es el encargado de llevar a cabo la hidrólisis del GTP presente en la β -tubulina. El modelo más aceptado para explicar la inestabilidad dinámica de la tubulina es el modelo del tapón.³⁷ Como se ha indicado anteriormente, la cadena del microtúbulos va creciendo manteniendo siempre el tapón de GTP en sus extremos. Este punto es fundamental en su estabilidad, ya que el GTP de los extremos actúa como un *tapón* que mantiene controlada la energía acumulada dentro de los microtúbulos cuando se produce la hidrólisis de GTP a GDP en la polimerización. Mientras existan las unidades de GTP en los extremos del microtúbulo el polímero es estable. Una vez eliminado el *tapón* de GTP se produce una despolimerización en cascada, liberándose los dímeros de tubulina y provocándose el intercambiando de GDP por GTP en cada subunidad β .

³⁷ Pantaloni, D.; Carlier, M. F. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, 466, 496-509.

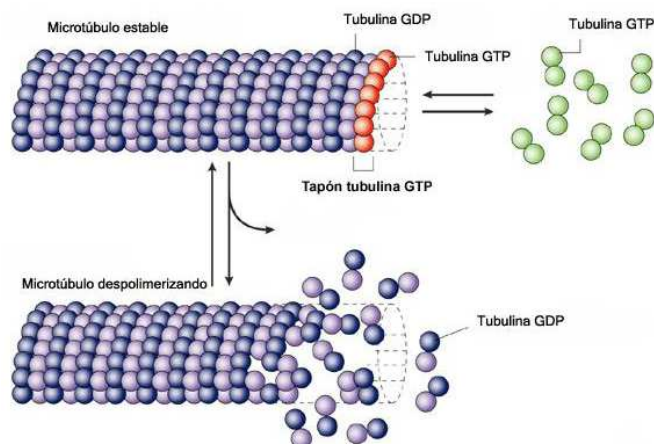


Figura 1.9. Dinámica de la despolimerización, con el papel de la tapadera (“cap”) de moléculas de GTP. El GTP unido a la tubulina sufre hidrólisis a GDP y P_i cuando un nuevo fragmento de tubulina se une al extremo del microtúbulo. El P_i se disocia del microtúbulo y deja atrás la tubulina unida a GDP.

Los compuestos que se unen a la tubulina pueden estabilizar o desestabilizar el proceso de formación de los microtúbulos, provocando en ambos casos la detención del proceso de mitosis y la consiguiente muerte celular.

Muchos fármacos antitumorales que tienen como diana biológica la tubulina³⁸ son productos naturales o derivados de los mismos.³⁹ La mayoría de estos fármacos interactúan con la β -tubulina, ejerciendo su acción antitumoral bien mediante la estabilización de los microtúbulos, bien mediante su desestabilización. Los compuestos conocidos que se unen a la α -tubulina solo ejercen su acción farmacológica mediante desestabilización de los microtúbulos.⁴⁰

La colchicina es un producto natural extraído de *Colchicum autumnale* que interacciona con la β -tubulina provocando desestabilización de los microtúbulos. Otros compuestos que interactúan con la β -tubulina y desestabilizan a los microtúbulos son la podofilotoxina, aislada de *Pdodophyllum peltatum* o mandrágora

³⁸ Mani, S.; Macapinlac, M. Jr.; Goel, S.; Verdier-Pinard, D.; Fojo, T.; Rothenberg, M.; Colevas, D. *Anticancer Drugs* **2004**, *15*, 553-558.

³⁹ (a) Altmann, K.-H., Gertsch, J. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 327-357. (b) Kingston, D. F. I. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3975-3984. (c) Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 507-515.

⁴⁰ (a) Sánchez-Pedregal, V. M.; Griesinger, C. *Top. Curr. Chem.* **2009**, *286*, 151-208. (b) Nettles, J. H.; Downing, K. H. *Top. Curr. Chem.* **2009**, *286*, 209-257. (c) Botta, M.; Forli, S.; Magnani, M.; Manetti, F. *Top. Curr. Chem.* **2009**, *286*, 279-328.

americana, y la vinblastina, alcaloide aislado de la planta *Catharanthus roseus* o vinca de Madagascar.⁴¹

Como ejemplos de compuestos que interaccionan con la β -tubulina estabilizando los microtúbulos cabe mencionar al paclitaxel, metabolito diterpénico aislado de la corteza del *Taxus brevifolia*,⁴² el docetaxel, análogo sintético del paclitaxel, la laulimalida, aislada de esponjas marinas del océano Pacífico,⁴³ y las epotilonas A-F, extraídas de la bacteria Gram-negativa *Sorangium cellulosum*.⁴⁴

El número de compuestos capaces de unirse a la subunidad α de la tubulina es muy reducido. El primer caso descrito fue el de la pironetina, metabolito secundario aislado de *Streptomyces* sp. NK-10958 y de cultivos de fermentación de *Streptomyces prunicolor* PA-48153.⁴⁵ Poco después se describieron las hemiasterlinas, tripéptidos de origen natural aislados de la esponja marina *Hemiasterella minor*, que presentan el mismo modo de acción que la pironetina.⁴⁶

⁴¹ (a) Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products*, John Wiley and Sons, 2^o Ed., **2002**. (b) Bioactive Natural Products (Attaur-Rahman, Ed.), Elsevier, **2007**. (c) Chen, J. et al. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1174-1190.

⁴² (a) Cragg, C.; Boyd, M.; Cardelina II, J.; Newman, D.; Snader, K.; McCloud, T. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. Ethnobotany and search for new drugs. Wiley & Sons. **1994**, 178. (b) Vega-Ávila, E.; Velasco-Lezama, R.; Jiménez-Estrada, M. *Bioquímica* **2006**, *31*, 97-111. (c) Nirmala, M. J.; Samundeeswari, A.; Sankar, P. D. *Res. Plant. Biol.* **2011**, *13*, 1-14.

⁴³ (a) Quiñoa, E.; Kakou, Y.; Crews, P. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3642-3644. (b) Corley, D. G.; Herb, R.; Moore, R. E.; Sheuer, P. J.; Paul, V. J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3644-3646.

⁴⁴ (a) Hoefle, G.; Bedorf, N.; Gerth, K.; Reichenbank, H. Patent DE 4138042, **1993**. (b) Gerth, K.; Bedorf, N.; Hoefle, G. et al. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 560-563.

⁴⁵ (a) Kobayashi, S.; Tsuchiya, K.; Harada, T.; Nishide, M.; Kurokawa, T.; Nakagawa, T.; Shimada, N.; Kobayashi, K. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 697-702. (b) Kobayashi, S.; Tsuchiya, K.; Kurokawa, T.; Nakagawa, T.; Shimada, N.; Iitaka, Y. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 703-707.

⁴⁶ (a) Talpir, R.; Benayahu, Y.; Kashman, Y.; Panell, L.; Schleyer, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4453-4456. (b) Coleman, J. E.; de Silva, E. D.; Kong, F.; Andersen, R. J.; Allen, T. M. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10653-10662.

3.2. Protooncogenes

El cáncer es una enfermedad genética en la cual la activación de protooncogenes y la desactivación de genes supresores de tumores provoca alteraciones en la regulación de la apoptosis y en el sistema de reparación del ADN.⁴⁷

Los genes implicados en la proliferación celular descontrolada se denominan oncogenes. La activación inapropiada de estos genes altera el ciclo celular y transforma una célula normal en una célula cancerosa. Muchos oncogenes derivan de genes normales denominados protooncogenes, los cuales regulan el crecimiento y el desarrollo. Los protooncogenes pueden sufrir cambios en su estructura o en su expresión. En este último caso las proteínas resultantes del proceso de traslación originan, por ejemplo, factores de crecimiento o receptores aberrantes en cantidades desproporcionadas, lo que altera el normal funcionamiento de las células.⁴⁸

Los protooncogenes *Myc* son una familia de genes que se encuentran en las células normales y codifican proteínas del núcleo celular que se unen al ADN y facilitan su transcripción regulando la actividad de otros genes. Dentro de esta familia tiene especial relevancia el gen *c-Myc*, que está implicado en procesos tempranos de embriogénesis, regula la transcripción de genes implicados en la proliferación y diferenciación celular⁴⁹ y en los procesos de apoptosis.⁵⁰ También participa en el control del crecimiento celular, interfiriendo en diversos procesos de progresión del ciclo celular.⁵¹ Una expresión desregulada de *c-Myc* puede causar translocaciones cromosomales asociadas a algunos tipos de cáncer, como el de próstata y los colorrectales. En la figura 1.10 se esquematizan las diversas funciones del gen *c-Myc*.

⁴⁷ Chen, B.-J.; Wu, Y.-L.; Tanaka, Y.; Zhang, W. *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, *10*, 1084-1096.

⁴⁸ Hernández, M.; Ríos-Hernández, M. A. *Rev. Cubana Oncol.* **1999**, *15*, 131-139.

⁴⁹ Hoffman, B.; Liebermann, D. A. *Oncogene* **2008**, *27*, 6462-6472.

⁵⁰ Fumagalli, M.; Rosiello, F.; Clerici M.; Barozzi, S.; Cittaro, D.; Kaplunov, J. M.; Bucci, G.; Dobrev, M.; Matti, V.; Beausejour, C. M.; Herbig U.; Longhese, M. P.; di Fagagna, F. D. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 355-365.

⁵¹ Henriksson, M.; Luscher, B. *Advanc. Cancer Res.* **1996**, *68*, 109-182.

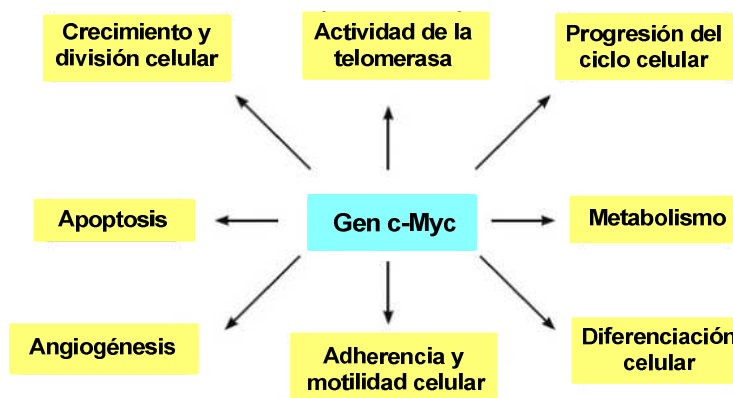


Figura 1.10. Diagrama de las diversas funciones celulares en las que participa el gen *c-Myc*.

3.3. Telómeros y telomerasa

3.3.1. Telómeros

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas no codificantes que constituyen las extremidades de los cromosomas y cuya longitud predice la capacidad replicativa de las células. Los telómeros fueron identificados por primera vez en 1938 por H. J. Muller. El premio Nobel de Medicina del año 2009 fue otorgado a E. H. Blackburn, C. W. Greider y J. W. Szostak por sus investigaciones sobre los telómeros y la telomerasa.⁵²

La conexión entre la estabilidad genómica y la función telomérica se describió por primera vez en 1931 por McClintock, quien demostró que los telómeros protegen los extremos de los cromosomas de los mecanismos de reparación y degradación del ADN y mantienen su integridad estructural impidiendo la fusión entre sus extremos.⁵³ Los telómeros también juegan un papel clave en el proceso de meiosis, permitiendo el apareamiento de los cromosomas. En la mitosis los telómeros participan en el anclaje de los cromosomas a la matriz nuclear y actúan como *reloj biológico* midiendo el número de divisiones celulares.⁵⁴

Los telómeros están formados por un tramo de secuencias de doble hebra, formada por repeticiones en tándem, y por un tramo final corto no codificante de

⁵² (a) Lilian-Chuaire, M. S. *Colomb. Med.* **2006**, 37, 332-335. (b) Corey, D. R. *Chem. Biol.* **2009**, 16, 1219-1223.

⁵³ McClintock, B.; Hill, H. E. *Genetics* **1931**, 16, 175-190.

⁵⁴ Blackburn, E. H. *Nature* **1991**, 350, 569-573.

cadena sencilla rico en residuos de guanina, con una longitud de 30-110 nucleótidos. En los vertebrados, los telómeros están formados por repeticiones en tandem de un hexámero de nucleótidos 5'-(TTAGGG)*n*-3' y de una serie de proteínas asociadas.⁵⁵ El número de repeticiones es específico de cada especie y varía en función de la vida de la célula. Los telómeros humanos contienen aproximadamente de 500 a 2.000 repeticiones, lo que viene a ser de 3.000 a 12.000 pares de bases.⁵⁶ El extremo 3' terminal del cromosoma presenta más repeticiones que el extremo 5'.⁵⁴

En la figura 1.11 se muestra un esquema de la localización de los telómeros en el cromosoma.

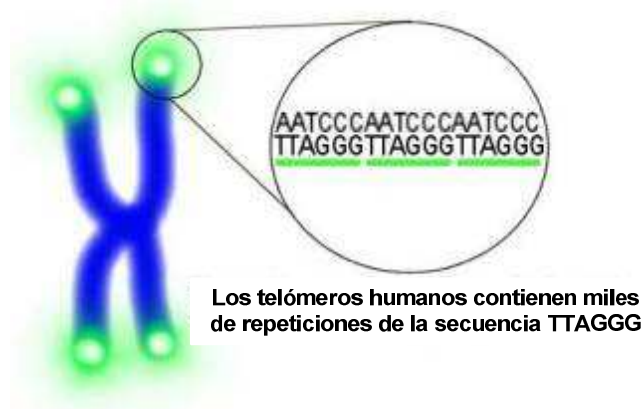


Figura 1.11. Ubicación de los telómeros en los cromosomas.

El telosoma, o complejo Shelterin, es un complejo proteico que protege las extremidades de los telómeros de posibles degradaciones y fusiones entre extremos de diferentes cromosomas mediante la formación de una estructura denominada *T-loop*, o bucle T, en cuyo interior se encuentra el bucle D⁵⁷ (véase la figura 1.12). La estructura de las secuencias subteloméricas juega un papel primordial en la formación de la estructura del telosoma.⁵⁸ El bucle T finaliza en una secuencia

⁵⁵ (a) Moyzis, R. K.; Buckingham, J. M.; Cram, L. S.; Dani, M.; Deaven, L. L.; Jones, M. D.; Meyne, J.; Ratliff, R. L.; Wu, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6622-6626. (b) Cheng, J. L.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. *Nucleic Acid Res.* **1989**, *17*, 61109-61127.

⁵⁶ McElligott, R.; Wellinger, R. J. *EMBO J.* **1997**, *16*, 3705-3714.

⁵⁷ de Lange, T. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2100-2110.

⁵⁸ Palm, W.; de Lange, T. *Annu. Rev. Gent.* **2008**, *42*, 301-334.

monohebra 3' que se intercala dentro de la la doble hebra y forma el bucle D.⁵⁹ La función de estas subestructuras está relacionada con la correcta segregación de las cromátidas hermanas y con la regulación y expresión de otros genes. La estructura *T-loop* impide que la cadena lineal del cromosoma pueda ser reconocida como una rotura de ADN,⁶⁰ y se debilita cuando la célula entra en fase S para permitir la replicación del extremo 3'.

La doble hebra telomérica está asociada a proteínas como TRF1, TRF2, TIN2 y Rap1, mientras que la hebra sencilla se encuentra asociada con POT1 y TPP1. La hebra sencilla se pliega hacia la doble cadena formando la estructura *T-loop* del telosoma, estabilizada por las proteínas teloméricas anteriormente mencionadas.⁶¹ En la figura 1.12 puede verse un esquema del complejo Shelterin y la estructura *T-loop*. Esta estructura en forma de bucle impide el acople de la telomerasa y debe ser desplegada durante la replicación del ADN telomérico.⁶²

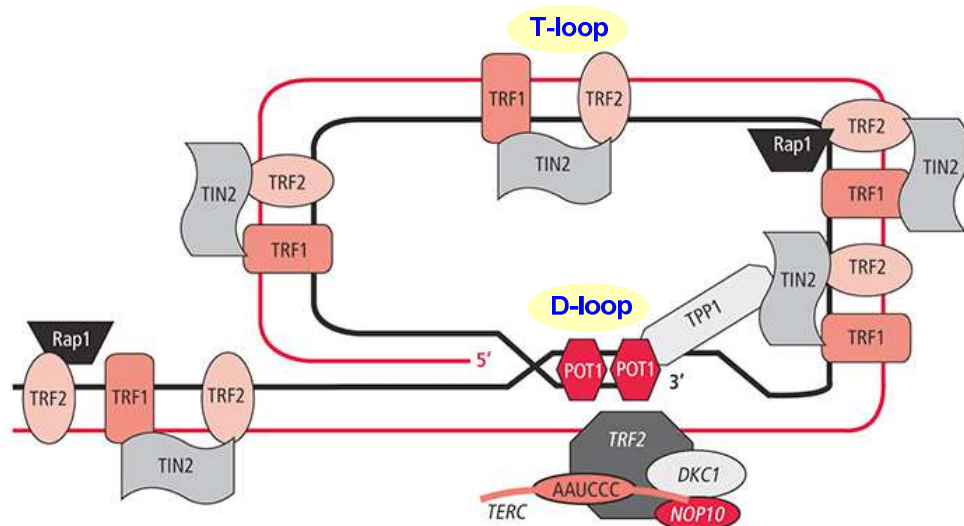


Figura 1.12. Complejo Shelterin o telosoma formando la estructura *T-loop* y la *D-loop*.

⁵⁹ Griffith, J. D.; Comeau, L.; Rosenfield, S.; Stansel, R. M.; Bianchi, A.; Moss, H.; de Lange, T. *Cell* **1999**, 97, 503-514.

⁶⁰ Shay, J. W. *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 3521-3525.

⁶¹ Deng, S.; Atanasiu, C.; Burg, J. S.; Broccoli, D.; Lieberman, P. M. *J. Virol.* **2003**, 77, 11992-12001.

⁶² Gavory, G.; Farrow, M.; Balasubramanian, S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 4470-4480.

Las proteínas asociadas al telómero también se presentan como prometedoras dianas biológicas, pues actuar contra ellas implica la alteración de la estructura *T-loop*, lo que conduce a la formación de un telómero desprotegido de cadena lineal, susceptible de ser reconocido por los mecanismos de reparación de ADN o por los mecanismos de fusión cromosómica, lo que provoca en última instancia inestabilidad genómica.⁶³

La proteína Rap1 (*Repressor/Activator protein 1*) es una de las proteínas asociadas a la doble hebra telomérica y se encarga de controlar la longitud telomérica en humanos a través de su interacción con TRF2, ya que TRF2 actúa como una proteína sensora de la longitud telomérica. Rap1 forma homodímeros que reconocen la secuencia telomérica, permitiendo la formación de un complejo más grande. Cuando Rap1 se sobreexpresa en células con actividad telomerasa produce acortamiento telomérico.⁶⁴

TRF1 (*Telomeric Repeat-binding Factor 1*) se encuentra en la región de doble hebra del telómero y regula la longitud telomérica, protegiendo el extremo 3' del cromosoma de la acción de las nucleasas. La inhibición de TRF1 provoca elongación de los telómeros, mientras que su sobreexpresión provoca acortamiento telomérico,⁶⁵ presentándose de este modo como un regulador negativo de la longitud telomérica.

TRF2 (*Telomeric Repeat-binding Factor 2*) se diferencia de TRF1 tanto en su ubicación como en sus funciones.⁶⁶ TRF2 se asocia a la región de doble cadena del telómero y es la responsable de la regulación y síntesis del telómero. Participa en la homeostasis del telómero y bloquea la activación de los sistemas de vigilancia de la integridad cromosómica.⁶⁷ TRF2 también es capaz de inhibir la recombinación homóloga y las fusiones teloméricas, provocando inestabilidad cromosómica. Al igual que TRF1, la sobreexpresión de TRF2 está relacionada con el acortamiento telomérico, jugando un papel clave en el mantenimiento de la longitud telomérica como regulador negativo. TRF2 es un potente factor oncogénico capaz de acelerar el proceso de carcinogénesis.⁶⁸

⁶³ Stewart, J. A.; Chaiken, M. F.; Wang, F.; Price, C. M. *Mutat. Res.* **2012**, 730, 12-19.

⁶⁴ Sarthy, J.; Bae, N. S.; Scrafford, J.; Baumann, P. *EMBO J.* **2009**, 28, 3390-3399.

⁶⁵ van Steensel, B.; de Lange, T. *Nature* **1997**, 385, 740-743.

⁶⁶ Smogorzewska, A.; Matsuoka, S.; Vinciguerra, P.; McDonald, E. R.; Hurov, K. E.; Luo, J.; Ballif, B. A.; Gygi, S. P.; Hofmann, K.; D'Andrea, A. D.; Elledge, S. J. *Mol. Cell Biol.* **2000**, 20, 1659-1668.

⁶⁷ Ohki, R.; Ishikawa, F. *Nucleic Acid Res.* **2004**, 32, 1627-1637.

⁶⁸ van Steensel, B.; Smogorzewska, A.; de Lange, T. *Cell* **1998**, 92, 401-413.

TIN2 (*TRF1 Interaction Nuclear Factor 2*) se une a TRF1, TRF2 y TPP1 y actúa como componente central en el complejo del telosoma.⁶⁹ TIN2 protege a TRF1 de las modificaciones que puede sufrir por las enzimas tankirasas y contribuye a la estabilización de la unión de TRF2 al ADN telomérico. Una disminución de TIN2, o la no unión a TRF1 ni a TRF2, produce elongaciones teloméricas.⁷⁰ Hasta la fecha, TIN2 se presenta como el único componente del telosoma con mutaciones identificadas en enfermedades humanas.⁷¹

POT1 (*Protection of Telomeres 1*) se une a la hebra sencilla de ADN y al ADN telomérico de cadena doble a través de su interacción con TRF1 y TRF2. Además, ayuda a mantener la estructura de *T-loop* junto con TRF2. POT1 juega un papel muy importante en la regulación de la longitud telomérica por la enzima telomerasa, pues cuando no se une a la hebra sencilla de ADN telomérico desencadena la pérdida de control de la longitud telomérica, siendo un blanco para la telomerasa, que actúa alargando los telómeros. Además, la unión de POT1 a la hebra sencilla de ADN evita la activación de la respuesta al daño de ADN.⁷²

TPP1 (*POT1 Interaction Protein 1*) se une a TRF1 y TRF2 a través de TIN2 y también se une a POT1. La supresión de TPP1, o la no unión con POT1, produce alargamiento telomérico. TPP1 se presenta como un factor esencial en la protección del final de los telómeros y como regulador de la longitud telomérica.⁷³

Recientemente se ha visto que existe una correlación entre la longitud de los telómeros y la longitud de la hebra sencilla de ADN, que es más larga en células tumorales que en células sanas.⁷⁴ También se ha comprobado que la conversión de la estructura *T-loop* en cadena lineal es dependiente de la longitud telomérica.⁷⁵ Así, cuanto mayor es la longitud telomérica, mayor es el número de proteínas asociadas a

⁶⁹ (a) O'Connor, M. S.; Safari, A.; Xin, H.; Liu, D.; Songyang, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11874-11879. (b) Sin, H.; Liu, D.; Songyang, Z. *Genome Biol.* **2008**, *42*, 301-334.

⁷⁰ Kim, S. H.; Kaminker, P.; Campisi, J. *Nat. Genet.* **1999**, *23*, 405-412.

⁷¹ (a) Savage, S. A.; Giri, N.; Baerlocher, G. M.; Orr, N.; Lansdorp, P. M. et al. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *82*, 501-509. (b) Tsangaris, E.; Adams, S. L.; Yoon, G.; Chitayat, D.; Lansdorp, P. et al. *Hum. Genet.* **2008**, *124*, 507-513.

⁷² Loayza, D.; de Lange, T. *Nature* **2003**, *424*, 1013-1018.

⁷³ Wang, F.; Podell, E. R.; Zaug, A. J.; Yang, Y.; Baciu, P.; Cech, T. R.; Lei, M. *Nature* **2007**, *445*, 506-510.

⁷⁴ Lee, J.; Sung, Y. H.; Cheong, C.; Choi, Y. S.; Jeon, H. K.; Sun, W.; Hahn, W. C.; Ishikawa, F.; Lee, H.-W. *Oncogene* **2008**, *27*, 3754-3760.

⁷⁵ Cristofari, G.; Lingner, J. *EMBO J.* **2006**, *25*, 565-574.

los telómeros, lo que impide el acceso a los mismos de la telomerasa y el subsiguiente alargamiento.⁵⁷

La cadena monohebra del telómero también adopta una estructura secundaria denominada G-cuadruplex que, al igual que el *T-loop*, tiene misiones de protección. La estructura de G-cuadruplex está compuesta por interacciones de guaninas de una misma hebra estabilizadas por interacciones con cationes monovalentes como Na^+ o K^+ (véase la figura 1.13). La formación de esta estructura al final de los telómeros impide el acceso de la telomerasa.⁷⁶ La estructura G-cuadruplex también se presenta como una diana terapéutica contra el cáncer, ya que su estabilización impediría el alargamiento de los telómeros por acción de la telomerasa.

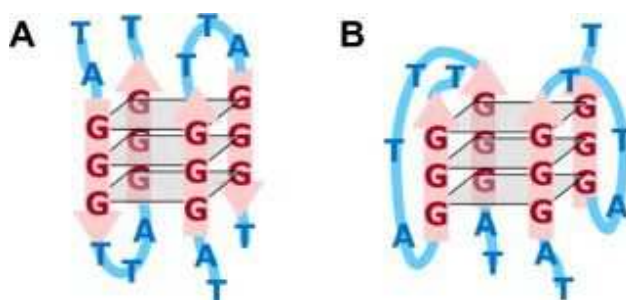


Figura 1.13. Estructuras G-cuadruplex de los extremos cromosómicos.

Numerosos estudios han demostrado que existe una correlación directa entre la longitud de los telómeros y la longevidad de los humanos. Dicha correlación fue descrita por primera vez por Olovnikov en 1973, quien sugirió que el acortamiento de las extremidades de los cromosomas limita la vida de las células.⁷⁷ Así, durante el proceso de replicación celular no se copia toda la secuencia del cromosoma, perdiéndose en cada replicación entre 50-100 pares de bases. Este fenómeno, conocido como problema de la replicación, se debe al modo de acción de la ADN-polimerasa, ya que esta enzima siempre requiere de un cebador de ARN de unos 8-12 nucleótidos que proporcione el extremo 5' de la nueva hebra y siempre lee el ADN en sentido 3'→5', sintetizando las nuevas hebras en sentido 5'→3'. Así, la ADN-polimerasa se mueve ininterrumpidamente desde el origen de la replicación hasta el final del cromosoma cuando la hebra molde es la 3'→5'. Sin embargo, cuando la

⁷⁶ Kaushik, M.; Kaushik, S.; Bansal, A.; Saxena, S.; Kukreti, S. *Curr. Mol. Med.* **2011**, *11*, 744-769.

⁷⁷ Olovnikov, A. M. *J. Theor. Biol.* **1973**, *41*, 181-190.

hebra molde es la 5'→3' su replicación debe ser forzosamente discontinua, originándose pequeños fragmentos de ADN que crecen en sentido 5'→3' y que más tarde se enlazan para generar una hebra continua. Esto provoca que el extremo 5' de la hebra retardada se vaya acortando progresivamente en cada replicación, por lo que los telómeros sufren una pérdida neta de 50-100 pares de bases en cada ciclo celular.^{77,78} En la figura 1.14 se esquematiza el acortamiento telomérico después de una replicación celular.

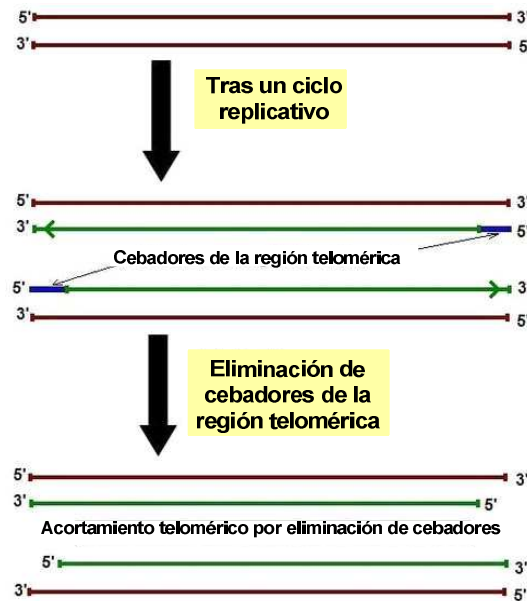


Figura 1.14. Acortamiento de telómeros tras la replicación celular.

La acción de ciertos oncogenes, del virus VIH⁷⁹ y de otros factores, como el estrés,⁸⁰ la obesidad y el tabaquismo,⁸¹ también pueden provocar acortamiento telomérico.

⁷⁸ Watson, J. D. *Nat. New Biol.* **1972**, 239, 197-201.

⁷⁹ Reynoso, R.; Minces, L.; Salomon, H.; Quarleri, J. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2006**, 22, 425-429.

⁸⁰ Epel, E. S.; Blackburn, E. H.; Lin, J.; Dhabhar, F. S.; Adler, N. E.; Morrow, J. D.; Cawthon, R. M. *P. P. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 17312-17315.

⁸¹ Valdes, A. M.; Andrew, T.; Gardner, J. P.; Kimura, M.; Oelsner, E.; Cherkas, L. F.; Aviv, A.; Spector, T. D. *Lancet.* **2005**, 366, 662-664.

El acortamiento del telómero no implica necesariamente ninguna patología, ya que esta región del ADN no es codificante. Sin embargo, cuando la longitud telomérica no es lo suficientemente larga como para preservar la integridad del cromosoma, la célula entra en fase crítica. Durante este periodo de crisis existe un estrecho balance entre el crecimiento y la muerte celular, decantándose el balance, en la mayoría de los casos, por la segunda opción, lo que provoca la entrada de la célula en senescencia o apoptosis.⁸² El número de veces que una célula puede dividirse antes de entrar en senescencia recibe el nombre de límite de Hayflick.⁸³ Así, la pérdida progresiva de los telómeros tras cada división celular se considera como una barrera ante la progresión tumoral. Sin embargo, la activación de la telomerasa en las células tumorales permite sobrepasar esta fase crítica, haciendo que el crecimiento celular gane la partida, sobrepasándose las señales de senescencia y apoptosis.⁸⁴

3.3.2. Telomerasa

La telomerasa es una enzima que impide que las células envejezcan, provocando el alargamiento telomérico.³⁴ La telomerasa fue identificada por primera vez por Greider y Blackburn en 1985.⁸⁵ En 1989 Morin describió la actividad telomerasa en células humanas.⁸⁶ La enzima telomerasa está formada por una subunidad de ARN, que sirve como molde para la síntesis del ADN telomérico, y que se conoce como hTR o TERC (*human Telomerase RNA*), otra subunidad proteica catalítica con actividad transcriptasa reversa, conocida como hTERT (*human Telomeric End Reverse Transcriptase*) y una proteína asociada denominada TEP1.⁸⁷ Un cuarto componente, denominado DKC1, está implicado en la estabilidad y plegamiento de hTR.⁸⁸

La telomerasa utiliza su componente ARN como molde para alargar los extremos 3' de las cadenas sencillas teloméricas, añadiendo ADN en la dirección 5'→3'.⁸⁹ Esta

⁸² Zou, Y.; Sfeir, A.; Gryaznov, S. M.; Shay, J. W.; Wright, W. E. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 3709-3718.

⁸³ Hayflick, L. *Exp. Cell Res.* **1965**, *37*, 614-636.

⁸⁴ (a) Wright, W. E.; Pereira-Smith, O. M.; Shay, J. W. *Mol. Cell Biol.* **1989**, *9*, 3088-3092. (b) Wright, W. E.; Shay, J. W. *Trends Cell Biol.* **1995**, *5*, 293-297.

⁸⁵ Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Cell* **1985**, *51*, 405-413.

⁸⁶ Morin, G. B. *Cell* **1989**, *59*, 521-529.

⁸⁷ Ebrahimnezhad, Z.; Zarghami, N.; Keyhani, M.; Amirsadat, S.; Akbarzadeh, A.; Rahmat, M.; Taheri, Z. M.; Nejati-Koshki, K. *BiolImpacts* **2013**, *3*, 67-74.

⁸⁸ Mitchell, J. R.; Wood, E.; Collins, K. *Nature* **1999**, *402*, 551-555.

⁸⁹ Collins, K.; Mitchell, J. R. *Oncogene* **2002**, *21*, 564-579.

región molde es complementaria al ADN telomérico y está formada por 11 nucleótidos de secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3' (véase la figura 1.15).⁹⁰ La telomerasa agrega secuencias repetitivas en el extremo 3'. Luego, una ADN polimerasa sintetiza las nuevas secuencias complementarias, impidiendo así el acortamiento telomérico.

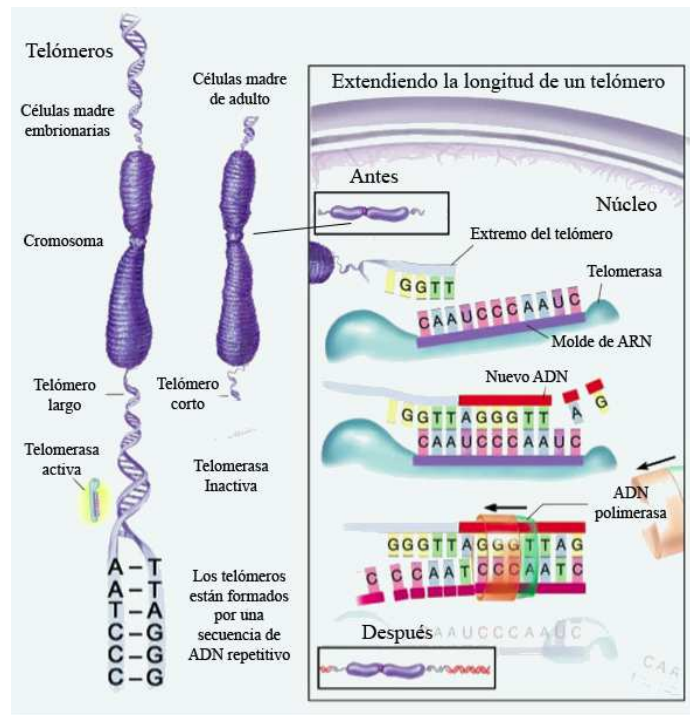


Figura 1.15. Acción de la telomerasa sobre los telómeros.

Se ha visto que algunos tumores y líneas celulares inmortalizadas mantienen la longitud de sus telómeros en ausencia de actividad de telomerasa por un mecanismo denominado alargamiento alternativo de los telómeros ALT (del inglés *Alternative Lengthening of Telomeres*),⁹¹ posibilitando la proliferación celular a largo plazo. Las células ALT carecen de actividad telomerasa y presentan estructuras características denominadas cuerpos nucleares que contienen TRF1, TRF2 y proteínas relacionadas con la recombinación y replicación del ADN.⁹² Sus telómeros son de longitud heterogénea debido a la ocurrencia de intercambios homólogos no recíprocos entre

⁹⁰ Gavory, G.; Farrow, M.; Balasubramanian, S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 4470-4480.

⁹¹ Cerone, M. A.; Londono-Vallejo, J. A.; Bacchetti, S. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, 10, 1945-1952.

⁹² Henson, J. D.; Neumann, A. A.; Yeager, T. R.; Reddel, R. R. *Oncogene* **2002**, 21, 598-610.

ellos,⁹³ eventos raros en células normales, por lo que se infiere que las células ALT han sufrido algún tipo de activación cuyo mecanismo es aún desconocido.

En la figura 1.16 se muestra el efecto ejercido sobre la longitud del ADN cuando la telomerasa se encuentra activada después de una replicación celular.

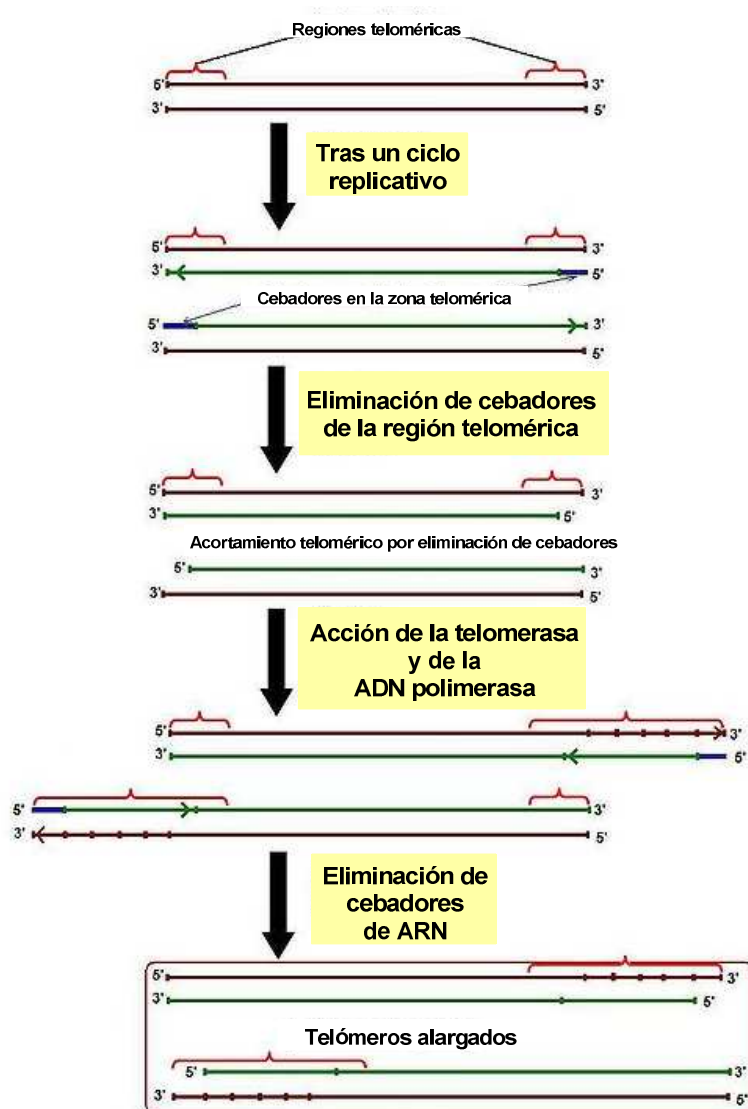


Figura 1.16. Acción de la telomerasa tras el proceso de replicación.

⁹³ Dunham, M. A.; Neumann, A. A.; Fasching, C. L.; Reddel, R. R. *Nat. Genet.* **2000**, 26, 447-450.

Además de encargarse del alargamiento telomérico, la telomerasa también tiene otras funciones, como las de mejorar la capacidad de reparación del ADN, suprimir genes que controlan el daño ocasionado en el ADN, promocionar el crecimiento y la proliferación celular e inhibir la apoptosis. Diversos estudios demuestran que en células somáticas la telomerasa se encuentra en niveles muy bajos e incluso indetectables, por lo que no es capaz de alargar los telómeros, lo que explica que la mayoría de las células humanas tengan un tiempo de vida relativamente corto (unas 100 divisiones).⁹⁴ Sin embargo, alrededor del 90% de los tumores malignos presentan actividad telomerasa,⁹⁵ la cual va agregando nucleótidos en cada ciclo celular,⁹⁶ lo que permite la regeneración de los telómeros y dota de *inmortalidad* a las células tumorales.^{97,98}

Las células proliferantes de cáncer presentan menor longitud telomérica que las células somáticas normales y esto es así porque los telómeros cortos permanecen más tiempo en estado lineal, lo que facilita el acceso de la telomerasa al extremo cromosómico durante la fase S del ciclo celular.⁹⁹

La subunidad hTR de la telomerasa se encuentra expresada en todas las células del organismo humano, mientras que la parte proteica hTERT únicamente se encuentra expresada en las células tumorales.¹⁰⁰ Diversos estudios han demostrado que, en la mayoría de las células, la regulación transcripcional de la expresión génica de *hTERT* representa la etapa limitante en el proceso de activación de la

⁹⁴ Blasco, M. A. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, 6, 611-622.

⁹⁵ (a) Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. *Science* **1994**, 266, 2011-2015. (b) Shay, J. W. *Mol. Med. Today* **1995**, 1, 378-384. (c) Shay, J. W.; Cacchetti, S. *Eur. J. Cancer* **1997**, 33, 787-791.

⁹⁶ Karlseder, J. *Cancer Lett.* **2003**, 194, 189-197.

⁹⁷ Zakian, V. A. *Exp. Cell Res.* **2012**, 318, 1459-1460.

⁹⁸ (a) Holt, S. E.; Glinsky, V. V.; Ivanova, A. B.; Glinsky, G. V. *Mol. Carcinog.* **1999**, 25, 241-248. (b) Lu, C.; Fu, W.; Mattson, M. P. *Dev. Brain Res.* **2001**, 131, 167-171. (c) Guo, X.-L.; Ma, N.-N.; Zhou, F.-G.; Zhang, L.; Bu, X.-X.; Sun, K.; Song, J.-R.; Li, R.; Chang, B.-H.; Wu, B.-H.; Wei, L.-X. *Oncol. Rep.* **2009**, 22, 549-556.

⁹⁹ (a) Bianchi, A.; Shore, D. *Mol. Cell* **2008**, 31, 153-165. (b) Zhao, Y.; Sfeir, A. J.; Zou, Y.; Buseman, C. M.; Chow, T. T.; Shay, J. W.; Wright, W. E. *Cell* **2009**, 138, 463-475.

¹⁰⁰ (a) Feng, J.; Funk, W. D.; Wang, S. S. et al. *Science* **1995**, 269, 1236-1241. (b) Avilion, A. A.; Piatyszek, M. A.; Gupta, J.; Shay, J. W.; Bacchetti, S.; Greider, C. W. *Cancer Res.* **1996**, 56, 645-650. (c) Yi, X.; Tesmer, V. M.; Savre-Train, I.; Shay, J. W.; Wright, W. E. *Mol. Cell Biol.* **1999**, 19, 3989-3997.

telomerasa.¹⁰¹ También se ha visto que *hTERT* únicamente se expresa en la fase S del ciclo celular y se ha comprobado que la habilidad para expresar la telomerasa y mantener el ADN telomérico es un paso crucial en la carcinogénesis.¹⁰²

También se ha demostrado que existen una serie de factores transcripcionales que participan en la expresión génica de *hTERT*, como el protooncogen *c-Myc* anteriormente mencionado. Varios estudios sugieren que *c-Myc* activa a la telomerasa induciendo expresión de *hTERT*.^{103,104} Otros estudios han demostrado que el gen *hTERT* contiene numerosos sitios de unión para *c-Myc*, que pueden mediar la activación transcripcional del gen.¹⁰⁵ *c-Myc* también se encuentra sobreexpresado en multitud de tumores humanos y, al ser un factor transcripcional de *hTERT*, aumenta indirectamente la actividad de la telomerasa, provocando consecuentemente la *inmortalidad* de las células tumorales.¹⁰⁴

Recientemente se han descrito unas ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) complementarias a la telomerasa humana que interactúan con ésta mediante la asociación a las secuencias repetitivas de los telómeros, participando por ello en la regulación de la longitud telomérica.¹⁰⁶

3.3.3. Senescencia

La senescencia es un proceso biológico que afecta a casi todas las células del organismo humano, contribuyendo al envejecimiento del organismo y previniendo el desarrollo de cáncer. Este proceso se caracteriza por impedir que las células proliferen a pesar de que sean viables y metabólicamente activas. La senescencia produce cambios en la expresión génica de las células y también cambios morfológicos, originando células estrechas y planas.¹⁰⁷

¹⁰¹ (a) Takakura, M.; Kyo, S.; Kanaya, T.; Tanaka, M.; Inoue, M. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1558-1561. (b) Kyo, S.; Kanaya, T.; Takakura, M.; Tanaka, M.; Inoue, M. *Int. J. Cancer* **1999**, *80*, 60-63. (c) Cong, Y. S.; Wen, J.; Bacchetti, S. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 137-142. (d) Boldrini, L.; Faviana, P.; Gisfredi, S.; Zucconi, Y.; Di Quirico, D.; Donati, V. *Int. J. Oncol.* **2002**, *21*, 493-497.

¹⁰² Philippi, C.; Loretz, B.; Schaefer, U. F.; Lehr, C. M. *J. Control. Release* **2010**, *146*, 228-240.

¹⁰³ Nakamura, T. M.; Morin, G. B.; Chapman, K. B.; Weinrich, S. L.; Andrews, W. H.; Lingner, J.; Harley, C. B.; Cech, T. R. *Science* **1997**, *277*, 955-959.

¹⁰⁴ Wang, J.; Xie, L. Y.; Allan, S.; Beach, D.; Hannon, G. J. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1769-1774.

¹⁰⁵ Wu, K.-J.; Grandori, C.; Amacker, M.; Simon-Vermot, N.; Polack, A.; Lingner, J.; Dalla-Favera, R. *Nature Genet.* **1999**, *21*, 220-224.

¹⁰⁶ Eversole, A.; Maizels, N. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 5425-5432.

¹⁰⁷ Martin, G. M.; Sprague, C. A.; Epstein, C. J. *Lab. Invest.* **1970**, *23*, 86-92.

Los telómeros pueden encontrarse protegidos o desprotegidos. El estado protegido se da en telómeros largos, en los cuales los extremos de los cromosomas se encuentran protegidos de la degradación por acción de las nucleasas y de la fusión de cromosomas. Cuando un telómero largo empieza a perder longitud telomérica pasa al estado desprotegido, quedando expuesto al ataque de las nucleasas y a la fusión cromosómica, provocando senescencia o inestabilidad cromosómica que, a su vez, dispara la señal para iniciar el proceso de apoptosis. La entrada en senescencia de la célula está mediada por p53 y retinoblastoma, siendo necesario que ambos mecanismos fallen simultáneamente para que la célula sea capaz de evadir la senescencia.¹⁰⁸ La acción de la telomerasa permite el alargamiento de un telómero corto, pudiendo de este modo llegar al estado protegido.

3.3.4. Fármacos antitelomerasa

La actividad de la telomerasa está estrechamente relacionada con la malignidad y resistencia de algunos tipos de cáncer, por lo que la inhibición de la actividad telomerasa podría servir como un mecanismo selectivo supresor de tumores.¹⁰⁹ La telomerasa se presenta como una interesante diana biológica, ya que está activada en muchos tipos de cánceres y su inhibición no afectaría a las células sanas. También se ha postulado que, con este tipo de terapia, es menos probable la aparición de resistencias. Aunque hoy en día no hay ningún fármaco con actividad antitelomerasa de uso clínico en tratamientos oncológicos, este tipo de fármacos se presentan como potenciales agentes anticáncer complementarios a los tratamientos antineoplásicos actuales.¹¹⁰

3.3.4.1. Inhibidores de hTERT

La acción de la telomerasa se puede inhibir mediante el bloqueo de su componente proteico hTERT. El compuesto citotóxico denominado BIBR1532 (véase su estructura en la figura 1.17) es capaz de reducir la longitud telomérica, inhibiendo la proliferación celular e induciendo senescencia.¹¹¹

¹⁰⁸ (a) Ferraira, M. G.; Miller, K. M.; Cooper, J. P. *Mol. Cell* **2004**, *13*, 7-18. (b) Kuimov, A. N. *Biochemistry* **2004**, *69*, 117-129.

¹⁰⁹ Hernández, R. A. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **1999**, *18*, 121-129.

¹¹⁰ Arvelo, F.; Morales, A. *Acta Científica Venezolana* **2004**, *55*, 288-303.

¹¹¹ (a) Damm, K.; Hemmann, U.; Garin-Chesa, P.; Huel, N. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6958-6968. (b) Pascolo, E.; Wenz, C.; Linger, J. et al. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15566-15572. (c) Kull, M.;

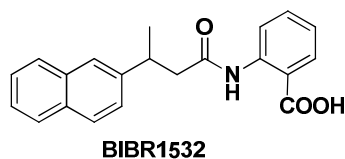


Figura 1.17. Estructura de BIBR1532.

3.3.4.2. Inhibidores de hTR

El componente hTR de la telomerasa, a diferencia de hTERT, está presente en tejidos normales.¹⁰⁰ No obstante, no se conoce ninguna función de hTR en las células que no expresan actividad telomerasa, por lo que su inhibición parece no tener efectos secundarios tóxicos *a priori*.¹¹⁰

El compuesto denominado Imetelstat, también conocido como GRN163L (véase su estructura en la figura 1.18) es un lípido genéticamente modificado complementario a la región molde del hTR¹¹² que induce el acortamiento telomérico, provocando la fusión cromosómica y la subsiguiente apoptosis.¹¹³

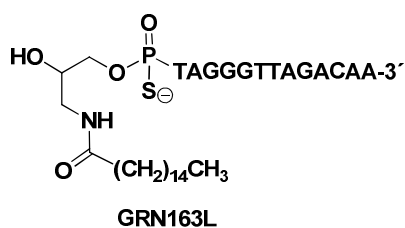


Figura 1.18. Estructura de GRN163L.

Zimmermann, S.; Pantic, M.; Waller, C. F.; Martens, U. M. *Blood* **2005**, *105*, 1742-1749. (d) Phatak, P.; Burger, A. M. *J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1003-1011.

¹¹² Herbert, B. S.; Gellert, G. C.; Hochreiter, A. et al. *Oncogene* **2005**, *24*, 5262-5268.

¹¹³ (a) Dikmen, Z. G.; Gellert, G. C. et al. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7866-7873. (b) Röth, A.; Harley, C. B.; Baerlocher, G. M. *Recent Results Cancer Res.* **2010**, *184*, 221-234.

3.3.4.3. Estabilizadores de la estructura G-cuadruplex

Una forma de inhibir la acción de la telomerasa implica la estabilización o interacción de determinado tipo de compuestos con la estructura G-cuadruplex del telómero.¹¹⁴ La telomestatina (véase la figura 1.19) es un producto natural aislado de *Streptomyces anulatus* que ha mostrado actividad antitelomerasa.¹¹⁵ La telomestatina interacciona con la estructura G-cuadruplex y provoca el acortamiento del telómero.¹¹⁶ El compuesto sintético BRACO-19 (véase la figura 1.19) estabiliza la estructura G-cuadruplex del telómero, impidiendo de este modo la acción de la telomerasa.¹¹⁷ Ambos compuestos han mostrado actividad tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos preclínicos.¹¹⁸

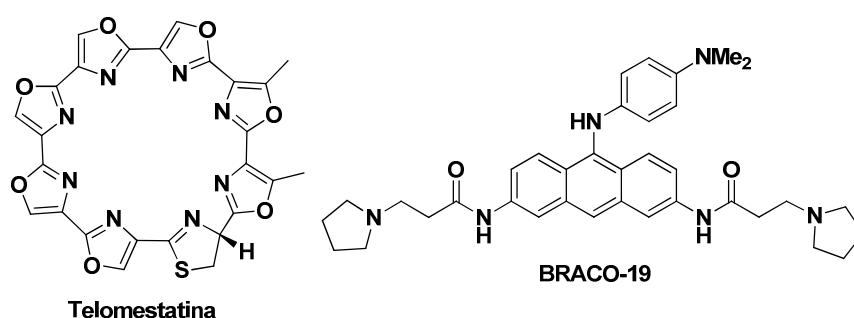


Figura 1.19. Estructuras de la telomestatina y de BRACO-19.

La telomestatina y el BRACO19 son poco solubles en agua, por lo que su farmacocinética es deficiente. Con el fin de paliar este inconveniente se diseñó el fármaco RHPS4 (véase su estructura en la figura 1.20), el cual presenta una mayor

¹¹⁴ Kerwin, S. M. *Curr. Pharm. Des.* **2000**, 6, 441-478.

¹¹⁵ Shin-Ya, K.; Wierzbka, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1262-1263.

¹¹⁶ Sumi, M.; Tauchi, T.; Sashida, G.; Nakajima, A.; Gotoh, A.; Shin-Ya, K.; Ohyashiki, J. H.; Ohyashiki, K. *Int. J. Oncol.* **2004**, 24, 1481-1487.

¹¹⁷ Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Double, J. A.; Neidle, S. *Cancer Res.* **2005**, 65, 1489-1496.

¹¹⁸ (a) Tauchi, T.; Shin-Ya, K.; Sashida, G.; Sumi, M.; Nakajima, A.; Shimamoto, T.; Ohyashiki, J. H.; Ohyashiki, K. *Oncogene* **2003**, 22, 5338-5347. (b) Balasubramanian, S.; Neidle, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 345-353.

hidrofilia.¹¹⁹ Este compuesto, al igual que el BRACO-19 y la telomestatina, ejerce su acción antitumoral mediante interacción con la estructura G-cuadruplex.¹²⁰

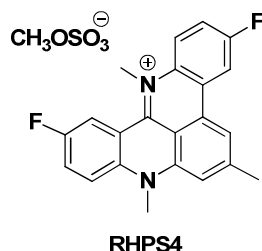


Figura 1.20. Estructura de RHPS4.

3.3.4.4. Inmunoterapia

Otra vía de actuación frente a la telomerasa se basa en la inmunoterapia.¹²¹ Se han conseguido vacunas basadas en células expuestas a altos niveles de hTERT y que, por consiguiente, presentan un antígeno.¹²² Otro tipo de vacunas contienen células modificadas genéticamente con sobreexpresión de hTERT.¹²³ Entre ellas destacan GV1001¹²⁴ y GRNVAC1.¹²⁵

Las células positivas en telomerasa pueden ser atacadas introduciendo genes suicidas dirigidos por un promotor de hTERT. Estos genes suicidas se introducen en el tumor, en el que inducen la apoptosis de las células con actividad telomerasa.¹²⁶ Alternativamente, los tumores pueden ser atacados mediante un profármaco activador de enzimas, que conduce a la apoptosis en células con actividad telomerasa.¹²⁷

¹¹⁹ Phatak, P.; Cookson, J. C.; Dai, F.; Smith, V.; Gartenhaus, R. B.; Stevens, M. F. G.; Burger, A. M. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 1223-1233.

¹²⁰ Salvati, E.; Leonetti, C.; Rizzo, A.; Scarsella, M. et al. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 3237-3247.

¹²¹ Patel, K. P.; Vonderheide, R. H. *Cytotechnology* **2004**, *45*, 91-99.

¹²² Vonderheide, R. H.; Hahn, W. C.; Schultze, J. L. et al. *Immunity* **1999**, *10*, 673-679.

¹²³ Su, Z.; Dannull, J.; Yang, B. K. et al. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 3798-3807.

¹²⁴ Inderberg-Suso, E. M.; Trachsel, S.; Lislerud, K.; Rasmussen, A. M.; Gaudernack, G. *Oncoimmunology* **2012**, *1*, 670-686.

¹²⁵ DiPersio, J. *Clinical Trials* **2007**.

¹²⁶ Liu, L.; Zou, W. G.; Lang, M. F.; Luo, J.; Sun, L. Y.; Wang, X. N.; Qian, Q. J.; Liu, X. Y. *Int. J. Oncol.* **2002**, *21*, 661-666.

¹²⁷ Plumb, J. A.; Bilisland, A.; Kakani, R.; Zhao, J.; Glasspool, R. M.; Knox, R. J.; Evans, T. R. J.; Keith, W. N. *Oncogene* **2001**, *20*, 7797-7803.

3.3.4.5. Terapia génica y viral

Otra vía de actuación frente a células telomerasa-positivas es el ataque mediante el uso de adenovirus que únicamente expresan las proteínas víricas necesarias para la replicación viral en células con actividad telomerasa.¹²⁸ Entre los diferentes virus diseñados destaca el OBP-301, conocido como Telomelysin.¹²⁹

Cabe mencionar que los fármacos antitelomerasa pueden requerir un tiempo de tratamiento para producir un telómero suficientemente corto como para desencadenar la muerte celular. Por ello, las terapias antitelomerasa pueden resultar más efectivas cuando son usadas en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales, con radioterapia o con agentes antiangiogénicos.¹³⁰

La terapia antitelomerasa también puede ser usada como terapia de mantenimiento para aumentar la longevidad, disminuyendo a su vez los efectos secundarios derivados de tratamientos a largo plazo.¹³⁰

3.4. Angiogénesis

Los vasos sanguíneos tienen la función de aportar nutrientes y oxígeno a las células. Su papel es fundamental en el crecimiento tanto de los tejidos normales como de los tumorales. La formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes se denomina angiogénesis. Este proceso implica la actividad coordinada de una serie de componentes vasculares, como la división de las células endoteliales que recubren los vasos, la degradación de las membranas basales vasculares y de la matriz extracelular mediante enzimas proteolíticas producidas por las células endoteliales, la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales y la maduración de los nuevos vasos sanguíneos.^{131,132} La angiogénesis juega un papel crucial en la supervivencia, progresión, invasión y metástasis de las células tumorales,

¹²⁸ Kyo, S.; Takakura, M.; Fujiwara, T.; Inoue, M. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 1528-1538.

¹²⁹ Nemunaitis, J.; Tong, A. W.; Nemunaitis, M.; Senzer, N.; Phadke, A. P.; Bedell, C.; Adams, N.; Zhang, Y. A.; Maples, P. B.; Chen, S.; Pappen, B.; Burke, J.; Ichimaru, D.; Urata, Y.; Fujiwara, T. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 429-434.

¹³⁰ Buseman, C. M.; Wright, W. E.; Shay, J. W. *Mutat. Res.* **2012**, *730*, 90-97.

¹³¹ Carmeliet, P. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 653-660.

¹³² Hoff, P. M.; Machado, K. K. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38*, 825-833.

por lo que se considera una buena diana para el tratamiento del cáncer.¹³³ En la figura 1.21 se representa el proceso de angiogenesis.

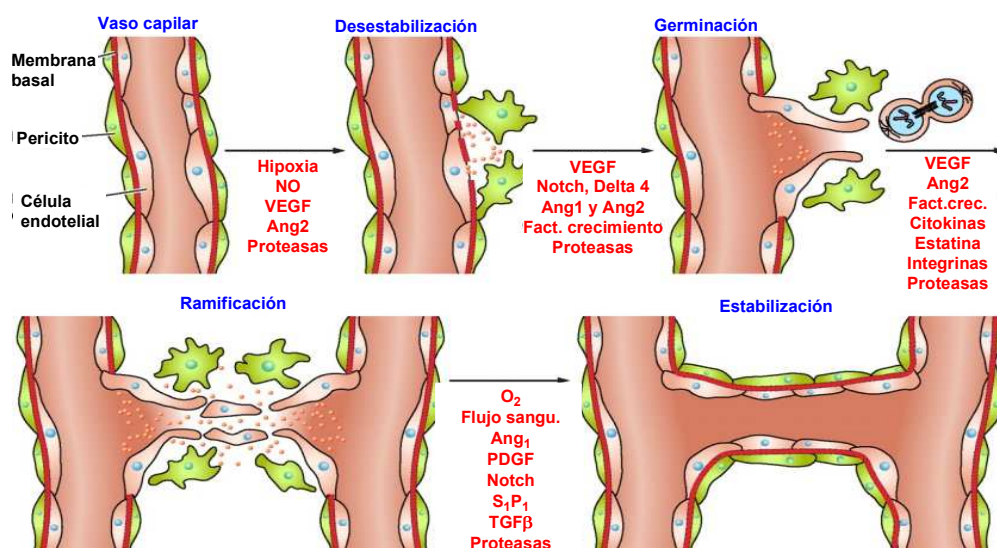


Figura 1.21. Proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos.

Las primeras observaciones sobre la angiogenesis se remontan al siglo XVIII, cuando el cirujano escocés John Hunter observó la formación de nuevos vasos sanguíneos en el seno de tejidos dañados e inflamados.¹³⁴

La angiogenesis es un proceso fundamental involucrado tanto en procesos fisiológicos como patológicos.^{135,136} En adultos, los mediadores pro- y anti-angiogénicos están en equilibrio,¹³⁷ y solo se sobreexpresan en procesos tales como la reproducción y el desarrollo embrionario, la isquemia, la cicatrización de heridas o la proliferación del endometrio durante el ciclo reproductivo.¹³⁸ El desequilibrio entre las señales reguladoras de la angiogenesis puede provocar procesos patológicos, ya sea por activación de la angiogenesis, ya sea por su inhibición. Por ejemplo, la

¹³³ Martinelli, E.; Troiani, T.; Morgillo, F.; Orditura, M.; De Vita, F.; Belli, G.; Ciardiello, F. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2013**, *18*, 25-37.

¹³⁴ Skalak, T. C. *Microcirculation* **2005**, *12*, 47-58.

¹³⁵ Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2000**, *407*, 249-257.

¹³⁶ Hanahan, D.; Folkman, J. *Cell* **1996**, *86*, 353-364.

¹³⁷ Muñoz-Chápuli, R.; Quesada, A. R.; Medina, M. A. *Cell Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2224-2243.

¹³⁸ Chung, A. S.; Lee, J.; Ferrara, N. *Nat. Cancer Rev.* **2010**, *10*, 505-514.

inhibición angiogénica puede provocar úlceras, esclerodermia, infertilidad, enfermedades del corazón, ataques cerebrovasculares y Alzheimer. Por el contrario, una angiogénesis sobreactivada¹³⁹ está en el origen de las hemorragias y la neovascularización ocular, que es uno de los casos más frecuentes de ceguera, la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, la psoriasis, la bartonelosis y el rechazo de órganos trasplantados.^{131,135}

La estimulación o la inhibición de la angiogénesis se lleva a cabo por diversas proteínas angiogénicas, incluyendo varios factores de crecimiento, entre los que destacan los mostrados en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Factores angiogénicos

Estimulador	Mecanismo
FGF	Promueve la proliferación y diferenciación de las células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos
VEGF	Afecta a la permeabilidad
VEGRF y NRP-1	Integra las señales de supervivencia
Ang1 y Ang2	Estabiliza los vasos sanguíneos
PDGF (BB-homodímero) y PDGFR	Recluta células del músculo liso
TGF- β , endogлина y TGF- β receptores	Aumenta la producción de matriz extracelular
Integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$	Enlaza la matriz de macromoléculas y proteinasas
VE-caderina y CD31	Controla las moléculas endoteliales de unión
Efrina	Determina la formación de venas y arterias
Activadores de plasminógeno	Remodela la matriz extracelular, libera y activa los factores de crecimiento
Activador plasminógeno inhibidor-1	Estabiliza los vasos cercanos
Id1/Id3	Regula la diferenciación endotelial

¹³⁹ *Recent Advances in Angiogenesis and Antiangiogenesis*. Chapter 4: Cross-Linked Between Inflammation and Angiogenesis. Crivellato, E.; Ribatti, D. **2009**, 30-39.

3.4.1. VEGF

La familia de proteínas VEGF juega un papel clave en la angiogénesis tumoral.^{141,142} La expresión de VEGF es elevada en muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal, de mama, de pulmón y otros tumores.^{143,144} También se correlaciona con la densidad de los microvasos, la diseminación metastásica en algunos tipos de tumores y en la recaída y la supervivencia de los enfermos de cáncer.^{145,146}

La expresión del VEGF está activada por la hipoxia, proporcionando un mecanismo de retroalimentación que compensa la falta de oxigenación tisular mediante la formación de nuevos vasos.

Las proteínas VEGF actúan sobre las células endoteliales vasculares a través de receptores de membrana tirosina-quinasa específicos, regulando de esta manera funciones celulares como la proliferación de células endoteliales y la migración y la expresión de quimioquinas, citoquinas y metaloproteinasas de la matriz (MMP).¹⁴⁷

La familia del VEGF¹⁴⁸ consta de seis glicoproteínas denominadas VEGF-A, VEGF-B,¹⁴⁹ VEGF-C,¹⁵⁰ VEGF-D,¹⁵¹ VEGF-E y PlGF.¹⁵²

El VEGF-A es una glicoproteína homodimérica de 45 kDa que está codificada por un solo gen, organizado en ocho exones separados por siete intrones.¹⁴² Se presenta en seis isoformas diferentes: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆, generadas como resultado del procesamiento alternativo del ARNm (véase la figura

¹⁴¹ Ferrara, N. *Semin. Oncol.* **2002**, 29, 10-14.

¹⁴² Ferrara, N.; Gerber, H. P.; LeCouter, J. *Nat. Med.* **2003**, 9, 669-676.

¹⁴³ List, A. F. *Oncologist* **2001**, 6, 24-31.

¹⁴⁴ Poon, R. T.-P.; Fan, S.-T.; Wong, J. J. *Clin. Oncol.* **2001**, 19, 1207-1225.

¹⁴⁵ Ellis, L.; Hicklin, D. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 579-591.

¹⁴⁶ (a) Ranieri, G.; Patruno, R.; Ruggieri, E.; Montemurro, S.; Valerio, P.; Ribatti, D. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 1846-1857. (b) Baker, L. C.; Boulton, J. K.; Walker-Samuel, S.; Chung, Y.-L.; Jamin, Y.; Ashcroft, M.; Robinson, S. P. *Br. J. Cancer* **2012**, 106, 1638-1647.

¹⁴⁷ <http://www.angiogenesis.es>

¹⁴⁸ Cao, Y. *Sci. Signal.* **2009**, 2, re1.

¹⁴⁹ Olofsson, B.; Pajusola, K.; Kaipainen, A.; von Euler, G.; Koukov, V.; Saksela, O.; Orpana, A.; Petersson, R. F.; Alitalo, K.; Eriksson, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 2576-2581.

¹⁵⁰ Joukov, V.; Pajusola, K.; Kaipainen, A.; Chilov, D.; Lahtinen, I.; Kukk, E.; Saksela, O.; Kalkkinen, N.; Alitalo, K. *EMBO J.* **1996**, 15, 1751.

¹⁵¹ Orlandini, M.; Marconcini, L.; Ferruzzi, R.; Oliviero, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11675-11680.

¹⁵² Maglione, D.; Guerriero, V.; Viglietto, G.; Dellibovi, P.; Persico, M. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 9267-9271.

1.23). El VEGF-A₁₆₅, la isoforma predominante del VEGF-A, es una molécula cargada positivamente que se une a la heparina. El VEGF-A₁₄₅ y el VEGF-A₁₈₃ son las variantes menos frecuentes. De las seis isoformas, las de menor tamaño, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ y VEGF₁₆₅, son secretadas al medio desde la célula tumoral y son las principales responsables de inducir un efecto mitogénico en las células endoteliales.¹⁵³ Por otra parte, las isoformas VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ se concentran en el citoplasma de la célula tumoral. Las distintas isoformas del VEGF-A incrementan la permeabilidad vascular, estimulan la proliferación y migración de células endoteliales, proveen a dichas células con señales de supervivencia y antisenescencia y además promueven la neuroprotección en desórdenes isquémicos. Además, la acción de VEGF-A constituye un paso limitante de la velocidad del crecimiento del vaso sanguíneo normal y patológico.¹⁴²

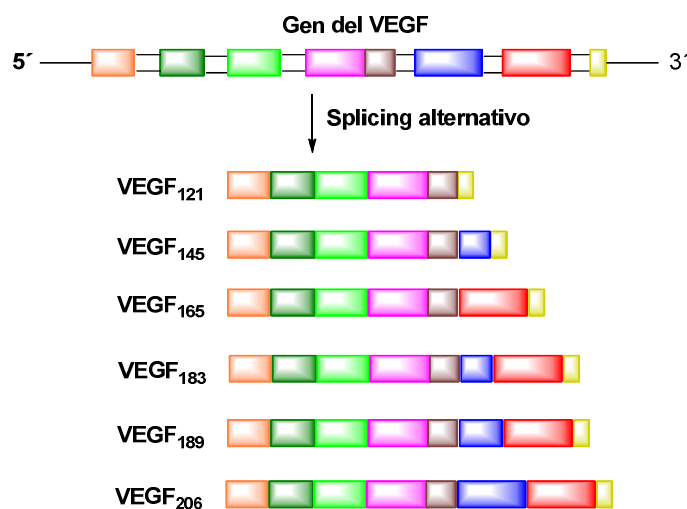


Figura 1.23. Formación de las isoformas del VEGF-A mediante *splicing* alternativo.

El VEGF-A emplea sitios de unión simétricos en cada polo del dímero para unirse tanto al VEGFR-1 como al VEGFR-2 y puede inducir heterodímeros entre estos dos receptores.¹⁵⁴

De VEGF-B se conocen dos isoformas, el VEGF-B₁₆₇ y el VEGF-B₁₈₆, cada una con 167 y 186 residuos de aminoácidos, respectivamente. La expresión del VEGF-B no está regulada por hipoxia. El VEGF-B estimula ligeramente la proliferación celular y es un

¹⁵³ Park, J. E.; Keller, G. A.; Ferrara, N. *Mol. Biol. Cell* **1993**, *4*, 1317-1326.

¹⁵⁴ Veikkola, T.; Karkkainen, M.; Cleasson-Welsh, L.; Alitalo, K. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 203-212.

ligando tanto para el VEGFR-1 como para la NRP-1 (*Neuropilin Receptor-1*), que actúa como co-receptor de los VEGFR. El VEGF-B se expresa en tejidos humanos normales, principalmente en el miocardio en desarrollo, pero también se expresa en tumores humanos benignos y malignos.¹⁵⁵

El VEGF-C es un potente factor de permeabilidad, aunque es 4-5 veces menos potente que el VEGF-A.¹⁵⁶ Se sintetiza como dímero pre-péptido (proteínas que requieren procesamiento post-traducciona) con un tamaño de 61 kDa por subunidad. La subsiguiente maduración proteolítica forma un homodímero de 21 kDa. Tanto las formas maduras del VEGF-C como las parcialmente procesadas se unen al VEGFR-3 con gran afinidad, mientras que solo las formas completamente procesadas se unen al VEGFR-2. El VEGF-C estimula la migración y proliferación de células endoteliales.¹⁵⁷ Su unión al VEGFR-3 regula la señalización del VEGFR-2, actuando de manera sinérgica con el VEGF-A. Además, está asociado a las células neuroendócrinas (NE), aunque sin participación aparente en el desarrollo de la vasculatura del sistema neuroendocrino.

El VEGF-D es un mitógeno para las células endoteliales y un ligando tanto para el VEGFR-2 como para el VEGFR-3.¹⁵⁸ Este factor es un compuesto linfangiogénico de menor potencia que el VEGF-C, que parece estar subexpresado durante el desarrollo, así como después de la organogénesis. Es importante destacar que VEGF-C y VEGF-D regulan la angiogénesis linfática.¹⁵⁹

El VEGF-E fue descubierto en el genoma del parapoxivirus Orf (cepa NZ-7), un virus ADN de cadena lineal doble, el cual causa dermatitis pustular contagiosa en ovejas, cabras y ocasionalmente en seres humanos. El VEGF-E, también nombrado como VEGF_{Orf}, carece del dominio de unión a heparina que sí presenta el VEGF-A. El VEGF-E se une y activa específicamente al VEGFR-2, resultando en un efecto mitogénico y en una actividad de permeabilidad vascular similar a la producida por el VEGF-A.¹⁶⁰

¹⁵⁵ Partanen, T. A.; Paavonen, K. *Microsc. Res. Tech.* **2001**, *55*, 108-121.

¹⁵⁶ Joukov, V.; Pajusola, K.; Kaipainen, A.; Chilov, D. et al. *EMBO J.* **1996**, *15*, 290-298.

¹⁵⁷ Lund, A. W.; Duraes, F. V.; Hirose, S.; Raghavan, V. R. *Cell. Rep.* **2012**, *1*, 191-199.

¹⁵⁸ Achen, M. G.; Jeltsch, M.; Kukk, E.; Mäkinen, T.; Vitali, A.; Wilks, A. F.; Alitalo, K.; Stacker, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 548-553.

¹⁵⁹ Stacker, S. A.; Achen, M. G.; Jussila, L.; Baldwin, M. E.; Alitalo, K. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 573-583.

¹⁶⁰ (a) Meyer, M.; Clauss, M.; Leppl-Wienhues, A.; Waltenberger, J.; Augustin, H. G.; Ziche, M.; Lanz, C.; Büttner, M.; Rziha, H.-J.; Dehio, C. *EMBO J.* **1999**, *18*, 363-374. (b) Wise, L. M.; Inder, M. K.; Real, N. C.; Stuart, G. S.; Fleming, S. B.; Mercer, A. A. *Cell Microbiol.* **2012**, *14*, 1376-1390.

3.4.2. Receptores de VEGF

El VEGF ejerce sus efectos sobre el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y la supervivencia de los vasos sanguíneos inmaduros al unirse y activar a los receptores VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. La unión del VEGF a estos receptores inicia una transmisión de señales en cascada que finalmente provoca la estimulación del crecimiento y la supervivencia y proliferación de las células del endotelio vascular.

Los receptores del VEGF-A son receptores transmembrana diméricos con actividad tirosina-quinasa (RTKs). Se localizan en la superficie de las células endoteliales vasculares y en la superficie de células derivadas de la médula ósea. La estructura de estos receptores está formada por siete dominios homólogos a inmunoglobulina (dominios Ig-like), colocados en la parte extracelular, una región transmembrana, un dominio yuxtamembranal y un dominio intracelular de señalización con actividad tirosina quinasa (KD), que está dividido por una inserción de quinasa (KI) y que acaba en la parte carboxi-terminal (véase la figura 1.24).¹⁶¹

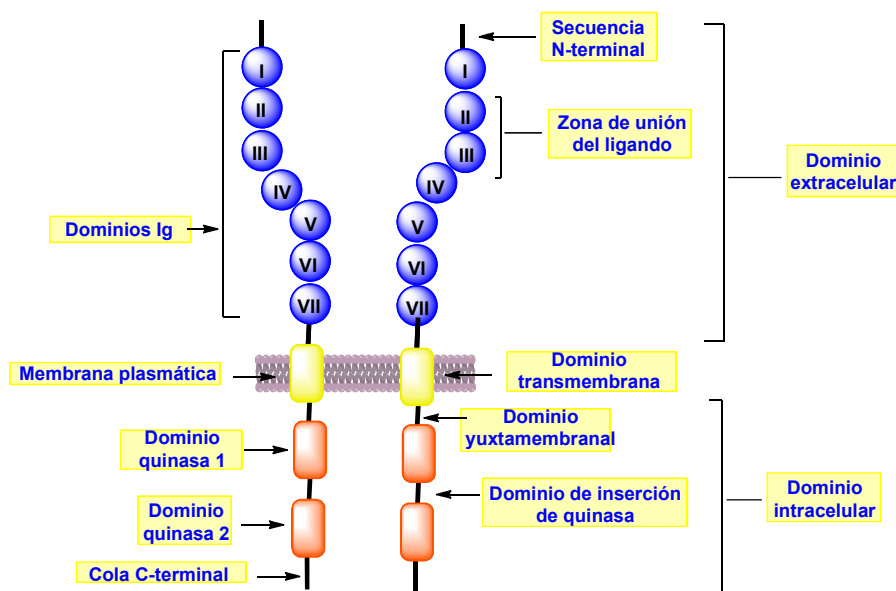


Figura 1.24. Representación esquemática de un receptor de VEGF.

¹⁶¹ (a) Terman, B. I.; Carrion, M. E.; Kovacs, E.; Rasmussen, B. A.; Eddy, R. L.; Shows, T. B. *Oncogene* **1991**, 6, 1677-1683. (b) Holmes, K.; Roberts, O. L.; Thomas, A. M.; Cross, M. J. *Cell Signal*. **2007**, 19, 2003-2012.

Al igual que otros RTKs, los receptores VEGFR dimerizan y experimentan *trans*-autofosforilación después de la unión al ligando, desencadenando una cascada de señalización mediante fosforilación de distintas proteínas, como la proteína-quinasa C (PKC), la fosfolipasa C-gamma (PLC- γ), el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y el blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR). La fosforilación del dominio quinasa de los VEGFR regula mecanismos involucrados en los procesos de angiogénesis.¹⁶²

Los receptores de VEGF (VEGFR) se identificaron en primer lugar sobre la superficie celular de las células endoteliales vasculares tanto *in vitro* como *in vivo*. Posteriormente, se descubrió que los receptores de VEGF también se encuentran en las células derivadas de la médula ósea. El VEGF-A se une a dos receptores de tirosina quinasas denominados VEGFR-1 y VEGFR-2. Además de estos dos receptores, el VEGF-A también interactúa con una familia de co-receptores, denominados neuropilinas, de las que existen dos isoformas, NP-1 y NP-2.

El receptor VEGFR-1 (Flt-1) fue el primer RTK identificado como receptor de VEGF.¹⁶³ Se cree que la función y las propiedades del VEGFR-1 pueden ser diferentes dependiendo de la etapa de desarrollo del organismo y del tipo de célula, por ejemplo, células endoteliales o células de médula ósea. La expresión del VEGFR-1 está regulada por las condiciones de hipoxia mediante un mecanismo dependiente de HIF-1 α .¹⁶⁴ El VEGFR-1 se une tanto a VEGF-A como a PlGF¹⁶⁵ y a VEGF-B,¹⁶⁶ que no se unen al VEGFR-2. Además se ha determinado que el VEGFR-1 sufre una débil autofosforilación de tirosina en respuesta a VEGF.¹⁶⁷

El receptor VEGFR-2 también se conoce como Kinase Domain Region (KDR) o Flk-1. El papel clave de este receptor en el desarrollo de la angiogénesis y la hematopoyesis se evidencia por la falta de vasculogénesis y la falta de desarrollo de islas de sangre y vasos sanguíneos organizados en ratones sin Flk-1, lo que conduce a

¹⁶² Dvorak, H. F. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 1835-1842.

¹⁶³ de Vries, C.; Escobedo, J. A.; Ueno, H.; Houck, K.; Ferrara, N.; Williams, L. T. *Science* **1992**, *255*, 989-991.

¹⁶⁴ Gerber, H. P.; Condorelli, F.; Park, J.; Ferrara, N. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23659-23667.

¹⁶⁵ Park, J. E.; Chen, H. H.; Winer, J.; Houck, K. A.; Ferrara, N. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25646-25654.

¹⁶⁶ Olofsson, B.; Korpelainen, E.; Pepper, M. S.; Mandriota, S. J.; Aase, K.; Kumar, V.; Gunji, Y.; Jeltsch, M. M.; Shibuya, M.; Alitalo, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11709-11714.

¹⁶⁷ Davis-Smyth, T.; Chen, H.; Park, J.; Presta, L. G.; Ferrara, N. *EMBO J.* **1996**, *15*, 4919-4927.

la muerte en el útero en un período de entre 8,5-9,5 días.¹⁶⁸ El VEGFR-2 es el receptor más importante para el VEGF-A y la interacción entre ambos es la mejor caracterizada en el proceso de angiogénesis.¹⁶⁹ Esta interacción es la responsable de la proliferación y migración de células endoteliales, así como de la permeabilidad vascular.

El VEGFR-3 muestra mayor afinidad por VEGF-C y VEGF-D.¹⁷⁰ Este receptor está involucrado en procesos de linfagiogenesis (formación de nuevos vasos linfáticos que transportan materiales de desechos y células del sistema inmunitario) y diseminación de células tumorales de los ganglios linfáticos.

3.4.3. Angiogénesis y cáncer

La angiogénesis tumoral provoca un crecimiento rápido de los vasos sanguíneos, los cuales presentan una vasculatura diferente a la habitual y una arquitectura con muchos huecos entre los nuevos vasos sanguíneos (véase la figura 1.25).¹⁷¹ La inadecuada formación de los vasos sanguíneos también provoca fugas que dan lugar a elevaciones de la presión intersticial tumoral, provocando hemorragias y edemas.¹³⁴

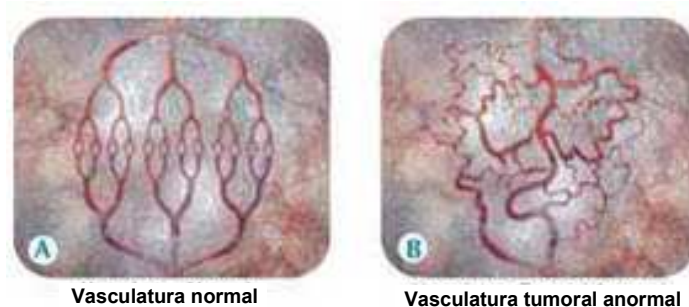


Figura 1.25. Diferencias entre la vasculatura normal y la tumoral.

Las células cancerosas necesitan un suministro constante de nutrientes y oxígeno para su desarrollo y proliferación. Este aporte se realiza a través de los vasos sanguíneos, por lo que se considera que el crecimiento del tumor, así como de los

¹⁶⁸ Shalaby, F.; Rossant, J.; Yamaguchi, T. P.; Gertsenstein, M.; Wu, X. F.; Breitman, M. L.; Schuh, A. C. *Nature* **1995**, 376, 62-66.

¹⁶⁹ Takahashi, T.; Shibuya, M. *Oncogene* **1997**, 14, 2079-2089.

¹⁷⁰ Karkkainen, M. J.; Makinen, T.; Alitalo, K. *Nat. Cell Biol.* **2002**, 4, E2-E5.

¹⁷¹ Baluk, P.; Hashizume, H.; McDonald, M. C. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, 15, 102-111.

tumores secundarios establecidos por metástasis, son procesos dependientes de la angiogénesis (véase la figura 1.26).^{172,173}



Figura 1.26. Angiogénesis tumoral.

Cuando el tumor crece más de 1-2 mm de diámetro, las células centrales quedan muy lejos de los vasos sanguíneos existentes y no reciben los nutrientes necesarios para sobrevivir, lo que provoca que el tumor se encuentre en condiciones de hipoxia.^{20,174} Esta falta de oxígeno activa el factor inducible de hipoxia (HIF-1 α),¹⁷⁵ que sobreexpresa diversos factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).¹⁷⁶ El VEGF estimula la migración de células endoteliales hacia zonas del tumor con hipoxia, activando la cascada de señalización de la angiogénesis.¹⁷⁷ Además, el factor HIF-1 α se une a la proteína supresora de tumores p53, estabilizándola y permitiendo el avance tumoral.¹⁷⁸ Sin embargo, diversos

¹⁷² Folkman, J.; Bach, M.; Rowe, J. W.; Davidoff, F.; Lambert, P.; Hirsch, C.; Goldberg, A.; Hiatt, H. H.; Glass, J.; Henshaw, E. *New Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182-1186.

¹⁷³ (a) Folkman, J.; Klagsbrun, M. *Science* **1987**, 235, 442-447. (b) Auerbach, R.; Auerbach, W.; Polakowski, I. *Pharmacol. Ther.* **1991**, 51, 1-11.

¹⁷⁴ Folkman, J. *Curr. Mol. Med.* **2003**, 3, 643-651.

¹⁷⁵ (a) Kachs, G. U.; Patterson, A. V. et al. *Nat. Med.* **1997**, 3, 515-520. (b) Fruehauf, J. P.; Meyskens, F. L. Jr. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 789-794.

¹⁷⁶ (a) Mazure, N. M.; Chen, E. Y.; Laderote, K. R.; Giaccia, A. J. *Blood* **1997**, 90, 3322-3331. (b) Folkman, J. *Semin. Oncol.* **2002**, 29, 15-18. (c) Beppu, K.; Nakamura, K.; Linehan, W. M.; Rapisarda, A.; Thiele, C. J. *Cancer Res.* **2005**, 65, 4775-4781.

¹⁷⁷ (a) Darland, D. C.; D'Amore, P. A. *J. Clin. Invest.* **1999**, 103, 157-158. (b) Neufeld, G.; Cohen, T.; Gengrinovitch, S.; Poltorak, Z. *FASEB J.* **1999**, 13, 9-22.

¹⁷⁸ (a) An, W. G.; Kenekal, M. et al. *Nature* **1998**, 392, 405-408. (b) Hansson, L. O.; Friedler, A. et al. *PNAS* **2002**, 99, 10305-10309. (c) Sanchez-Puig, N.; Weprintsev, D. B.; Fersht, A. R. *Mol. Cell* **2005**, 17, 11-21.

estudios han demostrado que p53 suprime la angiogénesis sobreexpresando la transcripción de factores antiangiogénicos, como la trombospondina-1 (TSP1).¹⁷⁹ La activación de los receptores VEGFR de las células endoteliales estimula la secreción de las enzimas MMP-2 y MMP-9, degradadoras de la matriz extracelular, favoreciendo la migración y la proliferación celular.¹⁸⁰ La expresión del VEGF también se puede incrementar por acción de citoquinas, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor transformador de crecimiento beta (TGF- β) y algunas proteínas reguladoras del ciclo celular, como p53.¹⁸¹

Recientes estudios han demostrado que la angiogénesis no solo juega un papel fundamental en la formación de tumores sólidos, sino que también tiene un papel crítico en células en suspensión de leucemia, en las que se observa un aumento de factores angiogénicos (bFGF, VEGF y VEGFR).¹⁸²

Un 30% de los cánceres presenta inflamación crónica, la cual a su vez promueve la angiogénesis. Es por ello que la detección de la inflamación sirve como agente angiopreventivo.¹⁸³ La enzima ciclooxigenasa COX-2 es la principal isoforma responsable de la inflamación y se encuentra sobreexpresada en multitud de cánceres. Su expresión se encuentra afectada por diversos estímulos como los mitógenos (factores que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular), oncogenes, promotores de tumores y factores de crecimiento.¹⁸⁴ Se ha mostrado que COX-2 promueve la angiogénesis favoreciendo la acción de las metaloproteínas MMP-2 y MMP-9, y favoreciendo también la producción de VEGF, de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) y de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas).¹⁸⁵ Diversos estudios han puesto de manifiesto que los inhibidores selectivos de COX-2 funcionan tanto como agentes quimiopreventivos como quimioterapéuticos.¹⁸⁶ Además, los inhibidores selectivos de COX-2 son capaces de

¹⁷⁹ (a) Dameron, K. M.; Volpert, O. V.; Tainsky, M. A.; Bouck, N. *Science* **1994**, 265, 1582-1584.

(b) Tokunaga, T.; Nakamura, M. et al. *Virchows Arch.* **1998**, 433, 415-418.

¹⁸⁰ Terman, B. I.; Stoletov, K. V. *Einstein Quart. J. Biol. Med.* **2001**, 18, 59-66.

¹⁸¹ Dvorak, H. F.; Brown, L. F.; Detmar, M.; Dvorak, A. M. *Am. J. Pathol.* **1995**, 146, 1029-1039.

¹⁸² (a) Letilovic, T.; Vrhovac, R. et al. *Cancer* **2006**, 107, 925-934. (b) Xu, W. L.; Shen, H. L.; Yuan, W.; Wang, F. C.; Jiang, Y. W. *Chinese J. Hematol.* **2006**, 27, 465-469.

¹⁸³ De Visser, K. E.; Eichten, A.; Coussens, L. M. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 24-37.

¹⁸⁴ Fournier, D. B.; Gordon, G. B. *J. Cell Biochem. Suppl.* **2000**, 34, 97-102.

¹⁸⁵ Gately, S.; Li, W. W. *Semin. Oncol.* **2004**, 31, 2-11.

¹⁸⁶ Anderson, W. F.; Umar, A.; Hawk, E. T. *Expert Opin. Pharmacother.* **2003**, 4, 2193-2204.

reducir el riesgo de sufrir Alzheimer¹⁸⁷ y Parkinson,¹⁸⁸ y también resultan efectivos en el tratamiento del asma.¹⁸⁹ El celecoxib, un inhibidor selectivo de COX-2, es un potente anti-inflamatorio que ha demostrado reducir la angiogénesis y la metástasis mediante inhibición de VEGF.¹⁹⁰

La inhibición farmacológica de la angiogénesis se presenta como una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades dependientes de la angiogénesis. Judah Folkman fue el primero en proponer la inhibición angiogénica como una nueva terapia anticáncer.¹⁹¹ Dado que en adultos la angiogénesis fisiológica tiene una importancia relativamente pequeña, la inhibición específica de este proceso podría tener unos efectos colaterales aceptables en relación con el beneficio terapéutico.¹⁹² En relación con los tradicionales métodos de quimioterapia o radioterapia, la inhibición de la angiogénesis en los procesos tumorales presenta las ventajas que se indican a continuación:

a) impide la vascularización del tumor y no afecta a las células, ya sean éstas sanas o cancerosas, teniendo, por tanto, menos efectos secundarios que la quimioterapia o la radioterapia.

b) es aplicable en cualquier tipo de cáncer, ya que la angiogénesis se produce en todos los tipos de tumores.

c) puede actuar en situaciones en las cuales el cáncer está en proceso de metástasis, fase en la que no actúan muchos fármacos antineoplásicos.

¹⁸⁷ (a) Quadros, A.; Patel, N.; Crescentini, R.; Crawford, F.; Paris, D.; Mullan, M. *Neurosci. Lett.* **2003**, *15*, 66-68. (b) Giovannini, M. G.; Scali, C.; Prosperi, C.; Bellocci, A.; Pepeu, G.; Casamenti, F. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2003**, *112*, 709-716.

¹⁸⁸ (a) Teismann, P.; Vila, M.; Choi, D. K.; Tieu, K.; Wu, D. C.; Jackson-Lewis, V.; Przedborski, S. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *991*, 272-277. (b) Hunot, S.; Vila, M.; Teismann, P.; Davis, R. J.; Hirsch, E. C.; Przedborski, S.; Rakic, P.; Flavell, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, *101*, 665-670.

¹⁸⁹ Profita, M.; Sala, A.; Bonanno, A.; Riccobono, L.; Siena, L. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *112*, 1029-1036.

¹⁹⁰ Wei, D.; Wang, L.; He, Y.; Xiong, H. Q.; Abbruzzese, J. L.; Xie, K. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2030-2038. Los inhibidores selectivos de COX-2 no están exentos de serios efectos secundarios ya que COX-2 es la enzima responsable de la síntesis de PGI₂, un agente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria. Al inhibir selectivamente COX-2 se rompe el balance entre el efecto anti-trombótico y el pro-trombótico (TxA₂), incrementando la posibilidad de una trombosis cardiovascular.

¹⁹¹ Folkman, J. *Cancer Biol. Ther.* **2003**, *2*, 127-133.

¹⁹² Carmeliet, P. *Nature* **2005**, *438*, 932-936.

d) no provoca mutaciones que dan lugar a resistencia a fármacos, ya que las células endoteliales presentan estabilidad genómica.

Por todos estos motivos la inhibición de la angiogénesis se ha convertido en una prometedora diana en el desarrollo de nuevas terapias que ayuden a combatir el cáncer. Sin embargo, la complejidad del proceso de angiogénesis y la enorme diversidad histológica y bioquímica de los tumores, que hace que cada cáncer siga un patrón de desarrollo y crecimiento único y específico, explica el que quede todavía mucho camino por recorrer en el desarrollo y aplicación de las terapias antiangiogénicas.¹⁹³

3.4.4. Fármacos antiangiogénicos

El empleo como monoterapia de fármacos antiangiogénicos detiene el crecimiento tumoral durante un cierto período de tiempo al impedir el aporte a gran escala de oxígeno y nutrientes al tumor. Sin embargo, no se consigue evitar el crecimiento del tumor a largo plazo, ni mucho menos su muerte o desaparición. Así, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos indican que el mayor éxito de las terapias antiangiogénicas tiene lugar cuando se combina con la quimioterapia tradicional mediante una actuación simultánea sobre las células tumorales y las endoteliales.^{94,135}

El papel clave que juega el VEGF en el proceso de angiogénesis explica el desarrollo de diversos agentes terapéuticos antitumorales que tienen como diana esta proteína.¹⁹⁴ De entre los fármacos antiangiogénicos empleados en la actualidad en tratamientos oncológicos destaca el anticuerpo monoclonal bevacizumab (Avastin®). El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado completo que se une selectivamente al VEGF-A, impidiendo su interacción con el VEGFR-2 (véase la figura 1.27).¹³³ El bevacizumab se emplea en el tratamiento del carcinoma metastásico de colon, en el cáncer de mama metastásico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de células renales avanzado y/o metastático y en el cáncer avanzado de ovario epitelial, trompa de Falopio o peritoneal primario.

¹⁹³ Escudier, B.; Eisen, T.; Stadler, W. M. et al. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356, 125-134.

¹⁹⁴ Casanovas, O.; Hicklin, D. J.; Bergers, G.; Hanahan, D. *Cancer Cell* **2005**, 8, 299-309.

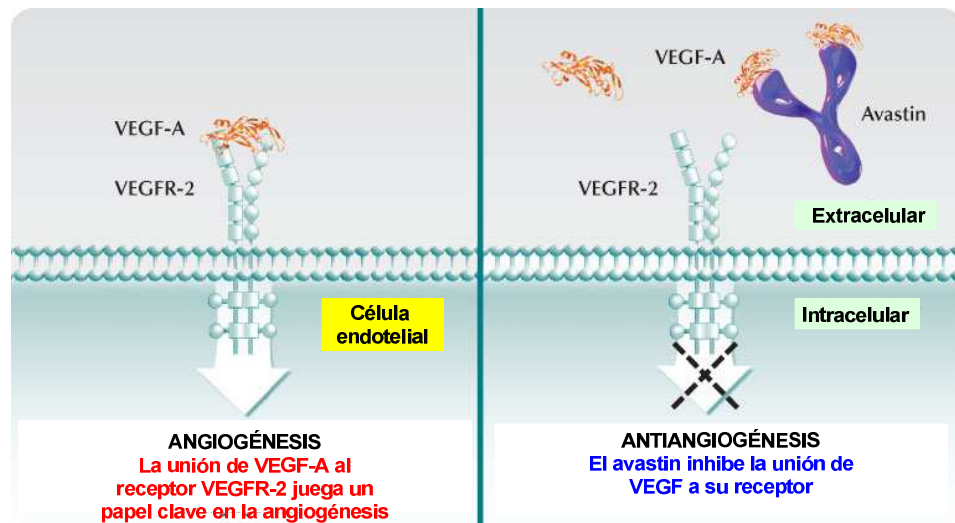


Figura 1.27. Representación del modo de acción del bevacizumab (Avastin®).

3.4.4.1. Inhibidores de quinasas

Los inhibidores de quinasas forman parte de las nuevas terapias biológicas dirigidas. Este tipo de terapia se centra en el uso de fármacos que bloquean el crecimiento y diseminación del cáncer actuando sobre biomoléculas implicadas en los procesos de señalización celular.

Las quinasas son enzimas encargadas de la transferencia de grupos fosfato. Este proceso es clave en las vías de señalización celular, ya que la adición del grupo fosfato provoca un cambio conformacional en la proteína, que es el responsable de la transmisión de la señal a un segundo mensajero. Por otro lado, las fosfatasas son las enzimas que se encargan de eliminar grupos fosfato, operación contraria a la que realizan las quinasas, de modo que las quinasas y las fosfatasas funcionan de modo coordinado para activar y desactivar las vías de señalización celular.

Las quinasas se dividen en dos grupos principales, las convencionales y las atípicas. A su vez, las quinasas convencionales se subdividen en ocho diferentes tipos, entre los que se encuentran las tirosina-quinasa (TKs). Algunas de estas funcionan como proteínas transmembrana receptoras (RTKs), que contienen un dominio extracelular, al que se unen diferentes ligandos, y un dominio intracelular, con actividad tirosina-quinasa (véase la figura 1.24).

El VEGF inicia el proceso de señalización celular uniéndose a una RTK. En la figura 1.28 se esquematiza la acción de los fármacos que actúan inhibiendo la acción del VEGF, ya sea por unión a esta proteína en la parte extracitosólica o mediante unión a la parte intracelular del receptor tirosina-quinasa del VEGF. De entre los primeros cabe destacar el bevacizumab, ya comentado anteriormente, así como el pegaptanib¹⁹⁵ y el ranibizumab,¹⁹⁶ que se emplean como fármacos antiangiogénicos para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

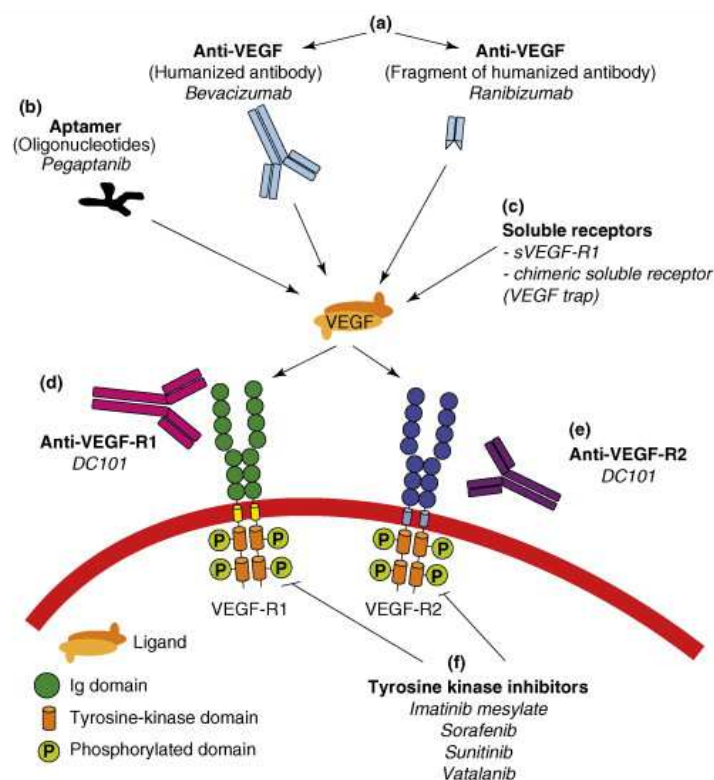


Figura 1.28. Esquema del modo de acción de los fármacos antiangiogénicos.

El primer fármaco inhibidor de quinasas empleado en terapias antitumorales fue el imatinib (véase la figura 1.29), que se comercializó por Novartis en 2001. Este

¹⁹⁵ Takeda, A. L.; Colquitt, J.; Clegg, A. J.; Jones, J. *Br. J. Ophthalmol.* **2007**, 91, 1177-1182.

¹⁹⁶ Martin, D. F.; Maguire, M. G.; Fine, S. L.; Ying, G.-S.; Jaffe, G. J.; Grunwald, J. E.; Toth, C.; Redford, M.; Ferris, F. L. *Ophthalmology* **2012**, 119, 1388-1398.

compuesto es un inhibidor de tirosina-quinazas y se emplea en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica.^{197,198}

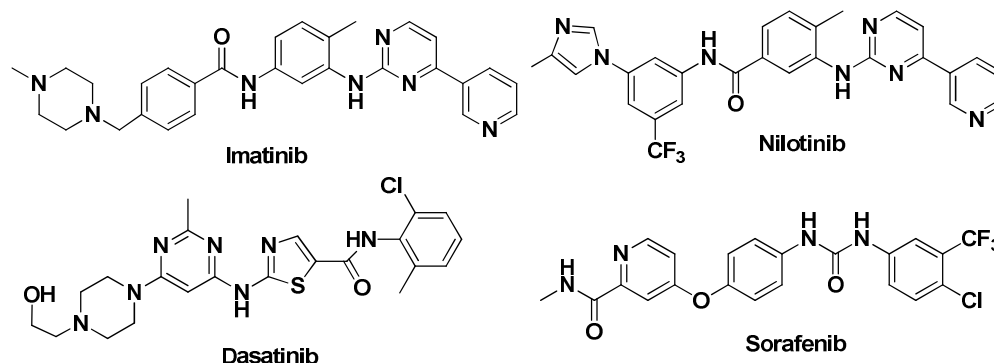


Figura 1.29. Estructuras de fármacos inhibidores de quinazas (1).

El nilotinib¹⁹⁹ y el dasatinib²⁰⁰ son también inhibidores de quinazas, comercializados por Novartis y Bristol-Myers-Squibbs, respectivamente. Se emplean en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica resistente a imatinib.

El sorafenib es un inhibidor multiquinasa, ya que es capaz de inhibir a tirosina-quinazas y a serina/treonina quinazas. Se emplea en el tratamiento del carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales avanzado y en el tratamiento del carcinoma diferenciado de tiroides.²⁰¹

Las estructuras de otros compuestos inhibidores de quinazas se indican en la figura 1.30. El sunitinib es un inhibidor de receptores tirosina-quinasa implicados en el crecimiento tumoral y la angiogénesis.²⁰² Se emplea en el tratamiento de tumores malignos no resecables y/o metastásicos del estroma gastrointestinal (GIST), en el carcinoma de células renales avanzado/metastásico y en el tratamiento de tumores neuroendocrinos pancreáticos (pNET) bien diferenciados, no resecables o metastásicos.

¹⁹⁷ Goldman, J. M.; Melo, J. V. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1451-1464.

¹⁹⁸ De Giorgi, U.; Verweij, J. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 495-501.

¹⁹⁹ Weisberg, E.; Manley, P.; Mestan, J.; Cowan-Jacob, S.; Ray, A.; Griffin, J. D. *B. J. Cancer* **2006**, *94*, 1765-1769.

²⁰⁰ Aguilera, D. A.; Tsimberidou, A. M. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2009**, *5*, 281-289.

²⁰¹ (a) Liu, L.; Cao, Y.; Chen, C.; Zhang, X.; McNabola, A.; Wilkie, D.; Wilhelm, S.; Lynch, M.; Carter, C. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11851-11858. (b) Goodman, V. L.; Rock, E. P.; Dagher, R. et al. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1367-1373.

²⁰² Carrato-Mena, A.; Grande-Pulido, E.; Guillén-Ponce, C. *Anticancer Drug* **2010**, *21*, S3-S11.

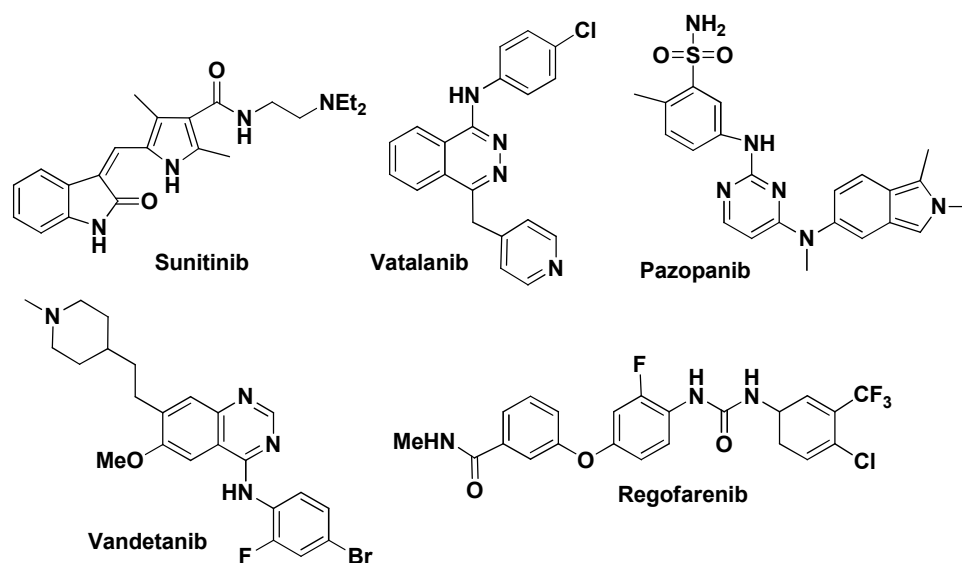


Figura 1.30. Estructuras de fármacos inhibidores de quinasas (2).

El vatalanib (PTK787 o PTK/ZK) es un inhibidor de la actividad tirosina-quinasa que actúa principalmente en los receptores del VEGF, en la subunidad beta del receptor de PDGF y de los también receptores TRK, c-kit y c-Fms. El vatalanib se encuentra en estudio en pacientes con recidivas de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o CPCNP refractario al tratamiento.²⁰³

El pazopanib inhibe los receptores de VEGF, del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), entre otros.²⁰⁴

El vandetanib es un potente inhibidor de VEGFR-2 y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Se emplea en el tratamiento del cáncer medular de tiroides (CMT) agresivo y sintomático en pacientes con enfermedad no resecable localmente avanzada o metastásica.²⁰⁵

²⁰³ Homsj, J.; Daud, A. I. *Cancer Control* **2007**, *14*, 285-294.

²⁰⁴ (a) Gotink, K. J.; Verheul, H. M. W. *Angiogenesis* **2010**, *13*, 1-14. (b) Keisner, S. V.; Shah, S. R. *Drugs* **2011**, *71*, 443-454.

²⁰⁵ Herbst, R. S.; Heymach, J. V.; O'Reilly, M. S.; Onn, A.; Ryan, A. J. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, *16*, 239-249.

El regofarenib exhibe actividad antiangiogénica mediante inhibición del receptor VEGFR-2 y se emplea en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico.²⁰⁶

3.5. Sirtuinas

Las sirtuinas son una familia de proteínas con actividad histona-desacetilasa (HDACs) que están implicadas en el metabolismo, respuesta frente al estrés y en los procesos de envejecimiento. En total se conocen cuatro familias de histona-desacetilasas (PDACs). En una de estas familias se engloban las sirtuinas, que son denominadas histona-desacetilasas clase III, ya que son las únicas desacetilasas que utilizan Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD⁺) como cosustrato, en lugar de zinc.^{207,208,209,210,211}

Los mamíferos presentan siete isoformas diferentes de sirtuínas (Sirt1-7), las cuales difieren entre sí en las proteínas que son capaces de desacetilar y en su localización intracelular, la cual correlaciona con su función.^{207,208}

El nombre de sirtuina proviene de *Silent mating type Information Regulation two*, el gen responsable de la regulación celular en el interior de las levaduras, y de *-ina*, terminación o sufijo convencional para las proteínas. Las sirtuinas son consideradas atractivos agentes terapéuticos, pues están involucradas en enfermedades como el cáncer, desórdenes neurodegenerativos, como Alzheimer, Parkinson y enfermedad de Huntington, diabetes y malnutrición.

Los inhibidores de HDACs dependientes de zinc exhiben propiedades antitumorales y dos ellos han sido aprobados para tratamientos de cáncer en los EE.UU. Sin embargo, las propiedades terapéuticas de los inhibidores de sirtuinas son mucho menos conocidas.^{209,210} Varios estudios han revelado que las células tumorales sobreexpresan Sirt1 favoreciendo su proliferación, por lo que la inhibición de esta enzima podría suprimir dicho fenómeno. También se ha visto que la inhibición simultánea de las sirtuinas 1 y 2 (Sirt1 y Sirt2) puede disminuir el crecimiento tumoral,

²⁰⁶ Strumberg, D.; Scheulen, M. E.; Schultheis, B.; Richly, H.; Frost, A.; Büchert, M.; Christensen, O.; Jeffers, M.; Heinig, R.; Boix, O.; Mross, K. B. *J. Cancer* **2012**, *106*, 1722-1727.

²⁰⁷ Moniot, S.; Weyand, M.; Steegbom, C. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 1-5.

²⁰⁸ Huber, K.; Superti-Fuga, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3616-3624.

²⁰⁹ Shlicker, C.; Boanca, G.; Lkshminarasimhan, M.; Steegborn, C. *Aging* **2011**, *3*, 852-872.

²¹⁰ Lawson, M.; Uciechowska, U.; Schemies, J.; Rumpf, T.; Jung, M.; Sippl, W. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1799*, 726-739.

²¹¹ Maurer, B.; Rumpf, T.; Scharfe, M.; Stolfa, D.; Schmitt, M.; He, W.; Verdin, E.; Sippl, W.; Jung, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1050-1053.

lo que abre la puerta al empleo de inhibidores de sirtuinas como potenciales agentes antitumorales.^{209,210}

Por otro lado, varios estudios han demostrado que existe una relación entre la actividad de las sirtuinas y la actividad de la telomerasa, enzima que, como ya se ha comentado anteriormente, se encuentra activa en muchas células cancerosas dotando de *inmortalidad* a las mismas.^{109,212} Las sirtuinas regulan varios genes relacionados con la actividad telomérica, como *hTERT* y *c-Myc*.²¹² Sirt1 activa la transcripción de *hTERT* vía *c-Myc*, aumentando de este modo el tiempo de vida celular.²¹³ Así, la sobreexpresión de Sirt1 promueve la proliferación celular, reduce la senescencia celular y aumenta el tiempo de vida de las células. La inhibición de Sirt1 debería inhibir indirectamente la actividad de la telomerasa. De hecho, numerosos estudios han mostrado que el aumento de la expresión de Sirt1 en fibroblastos humanos promueve la proliferación celular, reduce la senescencia y aumenta el tiempo de vida de los fibroblastos embrionarios humanos.²¹³ De este modo, un compuesto capaz de inhibir Sirt1 podría inhibir indirectamente la actividad de la telomerasa.

Una gran variedad de pequeñas moléculas han sido propuestas como activadores e inhibidores de sirtuinas. Sin embargo, la investigación sobre las sirtuinas está en sus inicios, por lo que todavía se conocen relativamente pocos sitios de unión para sus isoformas.²⁰⁷ Cabe mencionar que el resveratrol ha sido descrito como compuesto capaz de activar Sirt1 y aumentar la esperanza de vida en diferentes organismos.²¹⁴

Los activadores de sirtuinas pueden actuar como agentes terapéuticos en los tratamientos de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson o Huntington, entre otras.²¹⁵

Los inhibidores de sirtuinas también podrían funcionar como agentes anticáncer, puesto que la sobreexpresión de Sirt1 ha sido descrita en diferentes líneas celulares tumorales. De este modo, una inhibición de Sirt1 podría suprimir la proliferación celular tumoral.²¹⁶ Algunos ejemplos de inhibidores de sirtuinas se muestran en la figura 1.31.²¹⁰

²¹² Echeverri-Ruiz, N.; Mockus-Sivickas, I. *Rev. Fac. Med.* **2010**, *58*, 221-232.

²¹³ Yamashita, S.; Ogawa, K.; Ikei, T.; Udono, M.; Fujiki, T.; Katakura, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *417*, 630-634.

²¹⁴ Jiang, W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *373*, 341-344.

²¹⁵ Herskovits, A. Z.; Guarente, L. *Cell Research* **2013**, *23*, 746-758.

²¹⁶ Villalba, J. M.; Alcáin, F. J. *Biofactors* **2012**, *38*, 349-359.

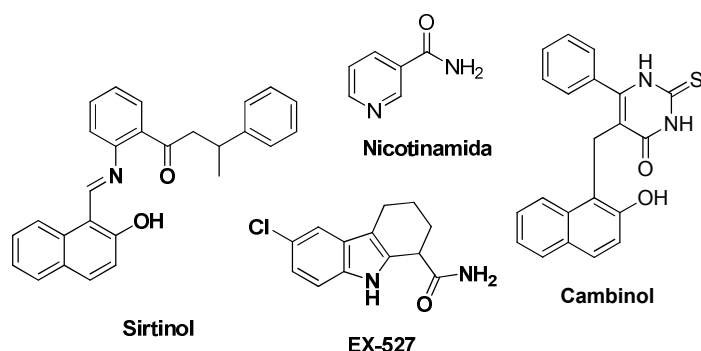


Figura 1.31. Inhibidores de sirtuinas.

Estudios recientes han mostrado que diversos compuestos que contienen un fragmento 5-furilidentioibarbitúrico o 5-arilidentioibarbitúrico, como los que se indican en la figura 1.32, muestran capacidad inhibitoria frente a las sirtuinas.^{210,211}

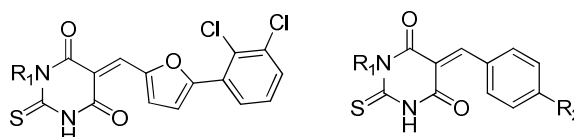


Figura 1.32. Estructuras de inhibidores de sirtuinas con unidad de tipo tiobarbitúrico.

4. Acción antiangiogénica de los polifenoles vegetales

Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto que el consumo regular de ciertos tipos de frutas y verduras reduce el riesgo de desarrollar cáncer. Este efecto beneficioso se relaciona, muy a menudo, con los polifenoles presentes en dichos alimentos y plantas.²¹⁷ Los resultados más concluyentes están relacionados con los compuestos designados como quimiopreventivos, que incluyen sustancias como el resveratrol, la curcumina, las catequinas del té, los triterpenos del ginseng o los flavonoides. Estos compuestos han mostrado ser capaces de reducir la proliferación de las células cancerosas, inhibiendo las vías de señalización de los factores de crecimiento, induciendo la apoptosis y/o suprimiendo la angiogénesis vascular.²¹⁸

²¹⁷ Liu, B. L. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1833-1836.

²¹⁸ Cao, Y. J. *Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 380-390.

Se conocen algunos compuestos que exhiben propiedades antiangiogénicas, como el honokiol y el magnolol, y otros que además son capaces de inhibir la actividad de la telomerasa, presentando por tanto una actividad dual. Entre estos últimos destacan el resveratrol y la curcumina.²¹⁹ En la figura 1.33 se representa la estructura química de estos compuestos.

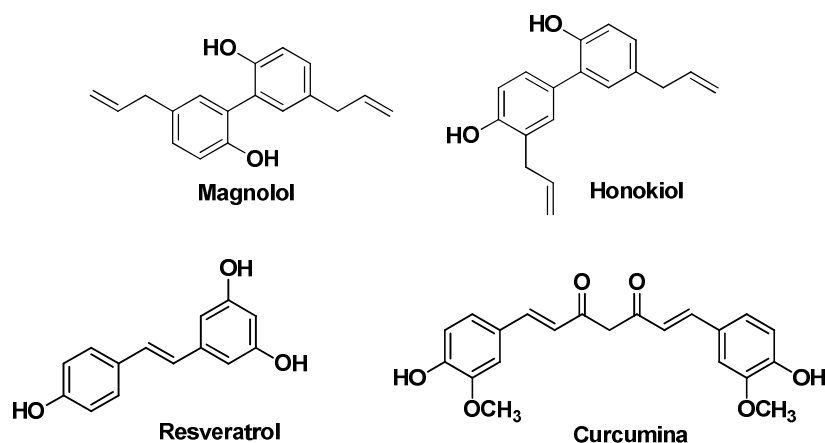


Figura 1.33. Fenoles de origen natural con actividad inhibidora de telomerasa y/o antiangiogénica.

El honokiol pertenece a la clase estructural de los denominados neolignan de tipo bifenílico. Este compuesto fue aislado en la década de los 70 de diversas especies del género *Magnolia*.²²⁰ Entre otras diversas propiedades farmacológicas,²²¹ se le han encontrado actividades antitumorales y antiangiogénicas.²²² El magnolol, isómero del

²¹⁹ (a) Bai, W.; Cerimele, F.; Ushio-Fukai, M.; Waqas, M.; Campbell, P. M.; Govindarajan, B.; Channing, J. D.; Battle, T.; Frank, D. A.; Keqiang Y.; Murad, E.; Dubiel, W.; Soffs, G.; Arbiser, J. L. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 35501-35507. (b) Cao, Y.; Zhao-Di, F.; Fang, W.; Hong-Yan, L.; Rui, H. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2005**, 7, 205-213. (c) Fuggetta, M. P.; Lanzilli, G.; Tricarico, M.; Cottarelli, A.; Falchetti, R.; Ravagnan, G.; Bonmassar, E. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2006**, 25, 189-193. (d) Sreenivasulu, K.; Vijayalakshmi, M. *Int. J. Biotech. Biochem.* **2010**, 6, 109-116.

²²⁰ Fujita, M.; Itokawa, H.; Sashida, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, 20, 212-213.

²²¹ (a) Maruyama, Y.; Kuribara, H. *CNS Drug Rev.* **2000**, 6, 35-44. (b) Shen, J.-L.; Man, K.-M.; Huang, P.-H.; Chen, W.-C.; Chen, D.-C.; Cheng, Y.-W.; Liu, P.-L.; Chou, M.-C.; Chen, Y.-H. *Molecules* **2010**, 15, 6452-6465.

²²² Fried, L. E.; Arbiser, J. L. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, 11, 1139-1148.

honokiol, también se encuentra en la corteza de *Magnolia officinalis* y de *Magnolia grandiflora* y presenta actividades antitumorales y antiangiogénicas.²²³

La curcumina es un colorante natural procedente de la cúrcuma, obtenida del rizoma de la planta del mismo nombre, cultivada principalmente en la India. Entre otras propiedades interesantes muestra actividad anti-inflamatoria, antioxidante y antitumoral.²²⁴ Se ha demostrado su poder antiangiogénico mediante la inhibición del VEGF y de las angiopoyetinas 1 y 2.²²⁵

El resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina producida por un gran número de especies vegetales como respuesta a infecciones por microorganismos patógenos y a condiciones de estrés.²²⁶ Pertenece a una clase estructural de productos naturales constituida por los derivados del estilbeno (*cis*- o *trans*-1,2-difeniletileno). Si bien el propio estilbeno no es un producto natural, diversos derivados polioxigenados del mismo han sido aislados de un gran número de fuentes naturales.²²⁷ Sin embargo, esta clase de compuestos no comenzó a despertar verdadero interés farmacológico hasta el descubrimiento de las muchas y variadas propiedades beneficiosas del resveratrol,^{228 229} compuesto que además ha resultado estar presente en diversos tipos de alimentos como la uva, los cacahuets y las moras y también en bebidas tales como el vino.²³⁰

²²³ Chem, M. C.; Lee, C. F.; Huang, W. H.; Chou, T. C. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1278-1287.

²²⁴ Mesa, M. D.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Aguilera, C. M.; Ramírez-Boscá, A.; Gil, A. *Ars. Pharmaceutica* **2000**, *41*, 307-321.

²²⁵ Dulak, J. J. *Physiol. Pharmacol.* **2005**, *56*, 51-69.

²²⁶ Liu, Z.; Li, Y.; Yang, R. *Oncol. Lett.* **2012**, *4*, 837-839.

²²⁷ Shen, T.; Wang, X.-N.; Lou, H.-X. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 916-935.

²²⁸ Pervaiz, S.; Holme, A. L.; Aggarwal, B. B.; Anekonda, T. S.; Baur, J. A.; Gojkovic-Bukarica, L.; Della Ragione, F.; Kim, A. L.; Pirola, L.; Saiko, P. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 2851-2897.

²²⁹ (a) Brisdelli, F.; D'Andrea, G.; Bozzi, A. *Curr. Drug Metab.* **2009**, *10*, 530-546. (b) Tyagi, S.; Singh, G.; Sharma, A.; Aggarwal, G. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2010**, *3*, 49-52. (c) Kroon, P. A.; Iyer, A.; Chunduri, P.; Chan, V.; Brown, L. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2442-2455.

²³⁰ (a) Kraft, T. E.; Parisotto, D.; Schempp, C.; Efferth, T. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 782-799. (b) Das, D. K.; Mukherjee, S.; Ray, D. *Heart Failure Rev.* **2010**, *15*, 467-477.

4.1. Resveratrol

El resveratrol fue aislado por primera vez de las raíces del eléboro blanco (*Veratrum grandiflorum*), planta que se encuentra en las zonas montañosas de Europa (Alpes y Pirineos principalmente), y en la especie *Fallopia japonica*, planta nativa de Asia oriental, Japón, China y Corea.²³¹ El resveratrol presenta múltiples actividades farmacológicas entre las que destacan su acción quimiopreventiva,²³² antioxidante,²³³ antiinflamatoria y antienvjecimiento,²³⁴ antiproliferativa,²³⁵ cardioprotectora,²³⁶ inmunoreguladora,²³⁷ proapoptótica²³⁸ y antitumoral,²²³ por lo que podría usarse en el control de la aterosclerosis,²³⁹ la hipertensión,²⁴⁰ las patologías cardíacas,²⁴¹ la artritis,²⁴² las enfermedades autoinmunes,²⁴³ diabetes,²⁴⁴ obesidad,²⁴⁵ Alzheimer,²⁴⁶ Parkinson,²⁴⁷ envejecimiento²⁴⁸ y cáncer.²⁴⁹ De hecho, el resveratrol es considerado uno de los compuestos quimiopreventivos más

²³¹ Baur, J. A.; Sinclair, D. A. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 493-506.

²³² Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V. et al. *Science* **1997**, *275*, 218-220.

²³³ de la Lastra, C. A.; Villegas, I. *Biochem Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1156-1160.

²³⁴ de la Lastra, C. A.; Villegas, I. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 405-430.

²³⁵ Schneider, Y.; Vincent, F.; Durantona, B.; Badolola, L.; Gosséa, F.; Bergmann, C.; Seilera, N.; Raula, F. *Cancer Lett.* **2000**, *158*, 85-91.

²³⁶ Wu, J. M.; Wang, Z.-R.; Hsieh, T.-C.; Bruder, J. L.; Zou, J.-G.; Huang, Y.-Z. *Int. J. Mol. Med.* **2001**, *8*, 3-17.

²³⁷ Gostner, J.; Ciardi, C.; Becker, K.; Fuchs, D.; Sucher, R. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 840-849.

²³⁸ Kloesch, B.; Dietersdorfer, E.; Loebisch, S.; Steiner, G. *Altern. Integr. Med.* **2014**, *3*:4.

²³⁹ Fan, E.; Zhang, L.; Jiang, S.; Bai, Y. *J. Med. Food* **2008**, *11*, 610-614.

²⁴⁰ Dolinsky, V. W.; Chakrabarti, S.; Pereira, T. J.; Oka, T. et al. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1832*, 1723-1733.

²⁴¹ Borriello, A.; Cucciollo, V.; Della Ragione, F.; Galletti, P. *Nutr. Metab. Cardiovas.* **2010**, *20*, 618-625.

²⁴² Elmali, N.; Baysal, O.; Harma, A.; Esenkaya, I.; Mizrak, B. *Inflammation* **2007**, *30*, 1-6.

²⁴³ Harikumar, K. B.; Aggarwal, B. B. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1020-1035.

²⁴⁴ Poulsen, M. M.; Vestergaard, P. F.; Clasen, B. F.; Radko, Y. et al. *Diabetes* **2013**, *62*, 1186-1195.

²⁴⁵ Baek, S.-H.; Chung, H.-J.; Lee, H.-K.; Roshan D'Souza, R. et al. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1-6.

²⁴⁶ Li, F.; Gong, Q.; Dong, H.; Shi, J. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 27-33.

²⁴⁷ Ferretta, A.; Gaballo, A.; Tanzarella, P.; Piccoli, C. et al. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1842*, 902-915.

²⁴⁸ Park, S.-J.; Ahmad, F.; Philp, A.; Baar, K. et al. *Cell* **2012**, *148*, 421-433.

²⁴⁹ (a) Wu, J. M.; Tsieh, T. C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1215*, 16-21. (b) Richard, T.; Pawlus, A. D.; Iglésias, M. L.; Pedrot, E.; Waffo-Teguo, P.; Mérillon, J. M.; Monti J. P. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1215*, 103-108. (c) Smoliga, J. M.; Baur, J. A.; Hausenblas, H. A. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1129-1141. (d) Gaytri, A.; Rana, A. C.; Ramica, S. *Int. Res. J. Pharm.* **2012**, *3*, 56-60.

interesantes. También está clasificado como un fitoestrógeno, por su capacidad de interactuar con receptores estrogénicos.²²⁵

Los primeros indicios de la actividad anticáncer mostrada por el resveratrol se hallaron en experimentos *in vivo*.²⁵⁰ Desde entonces, muchos derivados estilbénicos, incluyendo al propio resveratrol, han mostrado poseer actividad antitumoral.²⁵¹ Los efectos antitumorales del resveratrol son diversos y se producen a varios niveles, siendo muchas veces complementarios, ya que tiene acción quimiopreventiva, inhibe la proliferación celular, es un potente inductor de la apoptosis y ha demostrado efectividad terapéutica en estudios preclínicos en animales de experimentación.²⁵⁰ Además, el resveratrol es capaz de inducir diferenciación celular en diversas líneas celulares tumorales.²⁵² Numerosos estudios han concluido que el resveratrol es capaz de inhibir fenómenos asociados con la iniciación, promoción, progresión y desarrollo de tumores.^{232,253} Así, el resveratrol bloquea el ciclo celular en la fase S, impidiendo que se llegue a la fase G₂/M.^{254,255}

El efecto anticáncer del resveratrol varía según el tipo de células tumorales, habiendo mostrado una acción inhibitoria en células de osteosarcoma, así como en cánceres de pulmón, colon, páncreas, hígado y mama.^{223,195}

Como ya se ha indicado, el resveratrol es capaz de inducir apoptosis y/o senescencia en células tumorales, así como de suprimir la proliferación celular.^{256,257} Se ha determinado que el resveratrol inhibe el crecimiento celular mediante la activación de los genes supresores de tumores p53 y/o p21, e induce la apoptosis por

²⁵⁰ (a) Dong, Z. *Mutat. Res.* **2003**, 523-524, 145-150. (b) Bishayee, A. *Cancer Prev. Res.* **2009**, 2, 409-418.

²⁵¹ (a) Chillemi, R.; Sciuto, S.; Spatafora, C.; Tringali, C. *Nat. Prod. Comm.* **2007**, 2, 499-513. (b) Orsini, F.; Sello, G. *Studies in Natural Products Chemistry* (Bioactive Natural Products, Part N) (Ed. Atta-ur-Rahman), **2008**, 34, 77-127.

²⁵² (a) Damianaki, A.; Bakageorgou, E. et al. *J. Cell Biochem.* **2000**, 78, 429-441. (b) Pozo-Guisado, E.; Alvarez-Barrientos, A.; Mulero-Navarro, S.; Santiago-Josefat, B.; Fernandez-Salguero, P. M. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 64, 1375-1386. (c) Zhou, H. B.; Yan, Y.; Sun, Y. N.; Zhu, J. R. *World J. Gastroenterol.* **2003**, 9, 408-411.

²⁵³ Kundu, J. K.; Surh, Y. J. *Mutat. Res.* **2004**, 555, 65-80.

²⁵⁴ (a) Wolter, F.; Akoglu, B.; Clausnitzer, A.; Stein, J. J. *Nutr.* **2001**, 131, 2197-2203. (b) Liang, Y. C.; Tsai, S. H.; Chen, L.; Lin-Shiau, S. Y.; Lin, J. K. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 1053-1060.

²⁵⁵ Ragione, F. D.; Cucciolla, V. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 250, 53-58.

²⁵⁶ Clément, M. V.; Hirpara, J. L.; Chawdhury, S. H.; Pervaiz, S. *Blood* **1998**, 92, 996-1002.

²⁵⁷ (a) Mgbonyebi, O. P.; Russo, J.; Russo, I. H. *Int. J. Oncol.* **1998**, 12, 865-869. (b) Hsieh, T. C.; Wu, J. M. *Exp. Cell Res.* **1999**, 249, 109-115. (c) Huang, C.; Ma, W. Y.; Goranson, A.; Dong, Z. *Carcinogenesis* **1999**, 20, 237-242.

activación de las caspasas e inhibición de proteínas anti-apoptóticas en numerosas enfermedades malignas, incluyendo cáncer de mama, gástrico, de colon, de próstata y de ovario.²⁵⁸ Por otra parte, el efecto del resveratrol en la vascularización del tejido es, a su vez, ambigua y parece depender de cada situación específica.²⁵⁹

Se ha determinado que muchos derivados estilbénicos interaccionan con la β -tubulina en la zona de unión de la colchicina. Como se ha visto, la tubulina es una de las principales dianas biológicas en la terapia contra el cáncer. La tubulina es el constituyente de los microtúbulos,²⁶⁰ elementos del citoplasma que juegan un papel clave en la estructura del citoesqueleto de las células eucariotas y que están implicados en procesos biológicos tan importantes como la división celular (mitosis y meiosis), la motilidad de células y orgánulos, en el transporte intracelular y en el control de rigidez y estabilidad de la célula.

Diversos estudios han demostrado que el resveratrol y varios análogos del mismo exhiben actividad antiangiogénica^{224,225,261,262} e inhiben eficazmente *in vitro* la expresión del VEGF,²⁶³ el crecimiento de las células endoteliales de aorta de bovino (BAEC)²⁶⁴ y de células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVEC).²⁶³ Los mecanismos del efecto del resveratrol y varios análogos sobre la producción de VEGF implican la disminución de la expresión de esta proteína y la inhibición del factor de hipoxia HIF-1 α .²⁶⁵ La exposición a corto y largo plazo de un cultivo de células de tejido vascular a compuestos polifenólicos ha mostrado reducir los niveles de producción y expresión del VEGF como respuesta a una serie de activadores, como la trombina o el

²⁵⁸ Aggarwal, B. B.; Bhardwaj, A.; Aggarwal, R. S.; Seeram, N. P.; Shishodia, S.; Takada, Y. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 2783-2840.

²⁵⁹ Chen, Y.; Tseng, S. H. *In Vivo* **2007**, *21*, 365-370.

²⁶⁰ (a) Downing, K. H.; Nogales, E. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 16-22. (b) Nogales, E.; Wolf, S. G.; Downing, K. H. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 785-791. (c) Nogales, E.; Whittaker, M.; Milligan, R. A.; Downing, K. H. *Cell* **1999**, *96*, 79-88.

²⁶¹ (a) Brakenhielm, E.; Cao, R.; Cao, Y. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1798-1800. (b) Dachs, G. U.; Steele, A. J.; Coralli, C.; Kanthou, C.; Brooks, A. C.; Gunningham, S. P.; Currie, M. J.; Watson, A. I.; Robinson, B. A.; Tozer, G. M. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 280-290. (c) Durrant, D. E.; Richards, J.; Tripathi, A.; Kellogg, G. E.; Marchetti, P.; Eleopra, M.; Grisolia, G.; Simoni, D.; Lee, R. M. *Invest. New Drugs* **2009**, *27*, 41-52. (d) Athar, M.; Back, J. H.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Kim, A. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *486*, 95-102.

²⁶² Tseng, S. H.; Lin, S. M. et al. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 2190-2202.

²⁶³ Kimura, Y.; Sumiyoshi, M.; Baba, K. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 2083-2096.

²⁶⁴ Igura, K.; Ohta, T.; Kuroda, Y.; Kaji, K. *Cancer Lett.* **2001**, *171*, 11-16.

²⁶⁵ Cao, A.; Fang, J.; Xia, C.; Shi, X.; Jang, B. H. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 5253-5263.

factor transformador de crecimiento beta (TGF- β).²⁶⁶ De acuerdo con estos resultados, Tseng y colaboradores han demostrado que el resveratrol, en dosis de 40 mg/kg/día, suprime la angiogénesis y el crecimiento de los gliomas en ratas. El efecto es dependiente de la acción pro-apoptótica del resveratrol y de la reducción en la producción de VEGF.²⁵⁹ Otros estudios relacionan la capacidad antiangiogénica del resveratrol con su acción sobre las especies reactivas del oxígeno (ROS).

La baja toxicidad del resveratrol se ha demostrado en animales sanos sujetos a dieta suave de inducción de hipercolesterolemia leve, en los que la administración prolongada en bajas concentraciones de resveratrol no afectó a los niveles de colesterol, glucosa ni a las enzimas del hígado.²⁶⁷

Otros estudios han puesto de manifiesto que el resveratrol muestra citotoxicidad selectiva hacia células malignas, con una mínima citotoxicidad hacia células normales.^{253,268} Estudios recientes han demostrado que el resveratrol es capaz de aumentar la susceptibilidad de los tumores hacia otros agentes quimioterapéuticos.²⁶⁹ De hecho, actualmente el resveratrol se encuentra en ensayos clínicos tempranos como fármaco anticáncer para el tratamiento de cáncer de colon.²⁷⁰

Los mecanismos moleculares de la acción antitumoral del resveratrol han sido parcialmente elucidados e incluyen la supresión de factores de transcripción (como NF- κ B, AP-1 y Egr-1), el bloqueo de la expresión de genes antiapoptóticos y la activación de las caspasas, proteínas involucradas en los procesos de necrosis y apoptosis.²⁵⁵ A nivel bioquímico, el resveratrol disminuye la producción de diversas citoquinas pro-angiogénicas, como el VEGF y la interleucina 8 (IL-8).²⁷¹ El efecto protector del resveratrol sobre las células vasculares frecuentemente se atribuye a la neutralización de las especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno, las cuales se generan como producto de la activación de la cascada del VEGF. Lin y

²⁶⁶ Oak, M.-H.; Chataigneau, M.; Keravis, T.; Chataigneau, T.; Beretz, A.; Andriantsitohaina, R.; Stoclet, J.-C.; Chang, S.-J.; Schini-Kerth, V. B. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 1001-1007.

²⁶⁷ Azorín-Ortuño, M.; Yáñez-Gascón, M. J.; González-Sarrías, A.; Larrosa, M.; Vallejo, F.; Pallarés, F. J.; Lucas, R.; Morales, J. C.; Tomás-Barberán, F. A.; García-Conesa, M.-T.; Espín, J. C. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 829-837.

²⁶⁸ (a) Dörrie, J.; Gerauer, H.; Wachter, Y.; Zunino, S. J. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4731-4739. (b) Lee, S. K.; Zhang, W.; Sanderson, B. J. S. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7572-7577.

²⁶⁹ Rezk, Y. A.; Balulad, S. S.; Keller, R. S.; Bennett, J. A. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2006**, *194*, 23-26.

²⁷⁰ www.clinicaltrials.gov

²⁷¹ Zaidi, A. F. H.; Ahmed, K.; Yamamoto, T.; Kondo, T.; Usmanhany, K.; Kadowaki, M.; Sugiyama, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 1931-1935.

La simplicidad estructural, la baja toxicidad mostrada en ensayos *in vivo* y la alta actividad biológica hacen del resveratrol un prometedor compuesto en el tratamiento farmacológico.^{228,276}

4.1.1. Biodisponibilidad y metabolismo

El resveratrol se acumula en el colon, dónde muestra su mayor actividad, aunque también presenta actividad en otros tejidos donde no se produce su acumulación.²⁷⁷

El resveratrol es fácilmente absorbido por el organismo, sin embargo, el principal problema radica en su baja biodisponibilidad (<1%).²⁷⁸ El resveratrol es rápidamente metabolizado en el intestino y en el hígado debido a su alta afinidad por las proteínas plasmáticas, formando glucuronatos y sulfatos, los cuales son rápidamente excretados por la orina y la bilis.²⁷⁹ Los principales metabolitos del resveratrol son monosulfatos, dos formas isoméricas de monoglucoronido de resveratrol, monosulfato de dihidroresveratrol y monoglucoronidos de dihidroresveratrol,^{228,280} siendo el derivado de 3-*O*-sulfato el metabolito más abundante, seguido por el 3-*O*-glucoronido y el 4'-*O*-glucoronido (véase la figura 1.35).

²⁷⁶ Saiko, P.; Szakmary, A.; Jaeger, W.; Szekere, T. *Mutat. Res.* **2008**, 658, 68-94.

²⁷⁷ Patel, K. R.; Scott, E.; Brown, V. A.; Gescher, A. J. et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, 1215, 161-169.

²⁷⁸ (a) Goldberg, D. M.; Yan, J.; Soleas, G. *J. Clin. Biochem.* **2003**, 36, 79-87. (b) Wenzel, E.; Somoza, V. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, 472-481.

²⁷⁹ Walle, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M. H.; Oatis, J. E. Jr.; Walle U. K. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, 32, 1377-1382.

²⁸⁰ Marier, J. F.; Vachon, P.; Gritsas, A.; Zhang, J.; Moreau, J. P.; Ducharme, M. P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 302, 369-373.

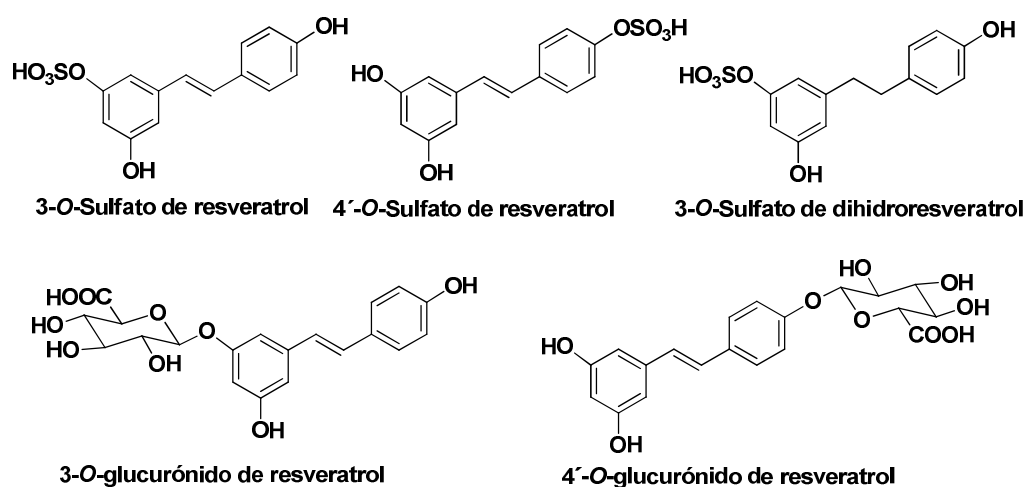


Figura 1.35. Estructuras de metabolitos de resveratrol.

Se han postulado diversas razones para justificar la actividad mostrada por el resveratrol a pesar de su baja biodisponibilidad:

a) Al igual que sucede con la quercetina (el flavonol más abundante en la dieta), los metabolitos del resveratrol se pueden desconjugar dejando libre a éste para que interactúe con sus tejidos diana.²⁸¹

b) Otra posibilidad es que sean los propios metabolitos del resveratrol los que actúen en las células. Una dieta diaria suplementada con 25 mg de resveratrol, administrado de manera oral, ya sea mediante vinos o zumos, produce una concentración de resveratrol en plasma en el rango nanomolar (1-5 ng/mL), mientras que la concentración de sus metabolitos se encuentra en el rango micromolar.²⁸² Cuando la dosis se aumenta a 5 g/día, la concentración en plasma de resveratrol aumenta hasta 530 ng/mL.²⁸³ Estudios *in vivo* han demostrado que algunos derivados glucosilados del resveratrol son mucho más activos que el propio resveratrol en la

²⁸¹ Galindo, P.; Rodríguez-Gómez, I.; González-Manzano, S.; Dueñas, M. et al. *PLoS One* **2012**, *7*, e32673.

²⁸² (a) Corder, R.; Crozier, A.; Kroon, P. A. *Nature* **2003**, *426*, 119. (b) Kaldas, M. I.; Walle, U. K.; Walle, T. J. *Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 307-312. (c) Aljada, A.; O'Connor, L.; Fu, Y. Y.; Mousa, S. A. *Angiogenesis* **2008**, *11*, 361-367. (d) Fraisl, P.; Mazzon, M.; Schmidt, T.; Carmeliet, P. *Dev. Cell* **2009**, *16*, 167-179.

²⁸³ Boocock, D. J.; Faust, G. E. S. et al. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**, *16*, 1246-1252.

prevención de la inflamación intestinal.²⁸⁴ Otras investigaciones han demostrado que los metabolitos del resveratrol pueden contribuir a la actividad farmacológica que exhibe éste, especialmente por lo que respecta a su actividad anticáncer.^{228,285} Así, el resveratrol resulta efectivo inhibiendo el crecimiento tumoral cuando se administra oralmente,²⁸⁶ y los metabolitos sulfatados, aunque presentan una actividad menor a la del propio resveratrol, también exhiben citotoxicidad en determinado tipo de células tumorales, como las de mama.²⁸⁷

En la figura 1.36 se muestra un esquema de las diferentes respuestas biológicas que provocan tanto el resveratrol como sus metabolitos.²⁸⁸

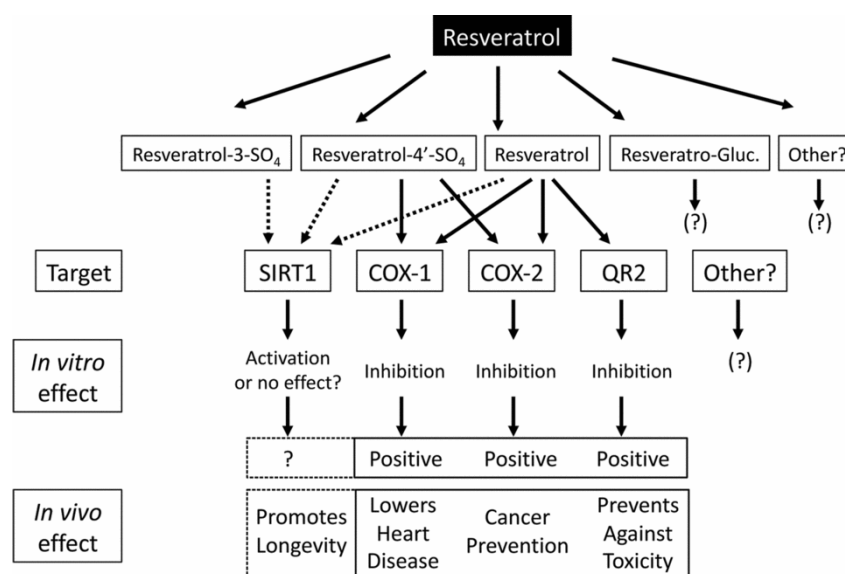


Figura 1.36. Respuestas biológicas del resveratrol y sus metabolitos.

²⁸⁴ Larrosa, M.; Tomé-Carneiro, J.; Yáñez-Gascón, M. J.; Alcántara, D.; Selma, M. V.; Beltrán, D.; García-Conesa, M.; Urban, C.; Lucas, R.; Tomás-Barberán, F. A.; Morales, J. C.; Espín, J. C. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 7365-7376.

²⁸⁵ Vang, O.; Ahmad, N.; Baile, C. A.; Baur, J. A. *PLoS One*, 6, e19881.

²⁸⁶ van Ginke, P. R.; Sareen, D. et al. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 5162-5169.

²⁸⁷ Miksits, M.; Wlcek, K. et al. *Planta Med.* **2009**, 75, 1227-1230.

²⁸⁸ Calamini, B.; Ratia, K.; Malkowski, M. G.; Cuendet, M. et al. *Biochemical J.* **2010**, 429, 273-282 (QR2=Quinona Reductasa 2).

4.1.2. Estudios SAR sobre el resveratrol

El interés terapéutico que ha despertado el resveratrol como potencial agente antitumoral ha fomentado en los últimos años una gran actividad científica con el fin de conocer mejor la relación entre su estructura y su actividad biológica. Los estudios de estructura-actividad (SAR) constituyen la base para el desarrollo de nuevos análogos de resveratrol con una actividad antitumoral más potente. Las principales modificaciones en la funcionalidad y el esqueleto estilbénico que afectan a la actividad biológica del resveratrol son:

- El grupo -OH de la posición 4' es esencial para mantener la actividad antioxidante y antiproliferativa del resveratrol.²⁸⁹ Recientemente se ha descubierto que la introducción de grupos electrón-donantes en posiciones *orto* y *para* respecto de la posición 4'-OH puede aumentar significativamente la actividad antioxidante.²⁹⁰ Además, el grupo -OH debe ser mantenido en posición 4' para conservar la actividad antiradical.²⁹¹
- La introducción de grupos hidroxilos adicionales en la estructura estilbénica incrementa la actividad antitumoral y pro-apoptótica.²⁹² Algunos de los análogos hidroxilados han mostrado ser inhibidores altamente selectivos de COX-2.²⁹³ La presencia de dos grupos hidroxilo en posición *orto* aumenta la actividad antioxidante.²⁹⁴

²⁸⁹ (a) Stivala, L. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 22586-22594. (b) Fang, J. G.; Lu, M.; Chen, Z. H.; Zhu, H. H.; Li, Y.; Yang, L.; Wu, L. M.; Liu, Z. L. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4191-4198.

²⁹⁰ Shang, Y.-J.; Qian, Y.-P.; Liu, X.-D.; Dai, F.; Shang, X.-L.; Jia, W.-Q.; Liu, Q.; Fang, J.-G.; Zhou, B. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 5025-5031.

²⁹¹ Medina, I.; Alcántara, D.; González, M. J.; Torres, P.; Lucas, R.; Roque, J.; Plou, F. J.; Morales, J. C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 9778-9786.

²⁹² Horvath, Z. *Anticancer Res.* **2010**, 27, 3459-3464.

²⁹³ (a) Murias, M.; Handler, N.; Erker, T.; Pleban, K.; Ecker, G.; Saiko, P.; Szekeres, T.; Jäger, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 5571-5578. (b) Saiko, P.; Peberger, M.; Horvath, Z.; Savinc, I.; Grusch, M.; Handler, N.; Erker, T.; Jaeger, W.; Fritzer-Szekeres, M.; Szekeres, T. *Oncol. Rep.* **2008**, 19, 1621-1626.

²⁹⁴ (a) Murias, M.; Jäger, W.; Handler, N.; Erker, T.; Horvath, Z.; Szekeres, T.; Nohl, H.; Gille, L. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 69, 903-912. (b) Ovesna, Z.; Kozics, K.; Bader, Y.; Saiko, P.; Handler, N.; Erker, T.; Szekeres, T. *Oncol. Rep.* **2006**, 16, 617-624.

- La sustitución de los hidroxilos del resveratrol por grupos metoxilo potencia sustancialmente su actividad citotóxica, incrementando la lipofilia y su biodisponibilidad.²⁹⁵
- Diversos análogos fluorados del resveratrol muestran una potencia igual o ligeramente superior a la del resveratrol.²⁹⁶
- Los derivados acetilados exhiben mejor biodisponibilidad, reteniendo la actividad citotóxica del resveratrol.²⁹⁷
- La glicosilación de las posiciones hidroxílicas del resveratrol le confiere protección frente al metabolismo oxidativo y prolonga su vida media en el organismo.²⁹⁸
- El cambio de uno de los átomos de carbono del doble enlace por un átomo de nitrógeno mejora la actividad antioxidante y neutralizante de ROS, especialmente si el derivado imínico presenta un grupo hidroxilo en posición *orto* respecto del átomo de nitrógeno.²⁹⁹
- Algunos análogos *cis*-estilbénicos son más citotóxicos que los correspondientes isómeros *trans*,³⁰⁰ aunque en el caso particular del resveratrol, su actividad citotóxica es mayor la que de su isómero *cis*.

²⁹⁵ Lee, S. K.; Nam, K. A.; Hoe, Y. H.; Min, H. Y.; Kim, E. Y.; Ko, H.; Song, S.; Lee, T.; Kim, S. *Arch. Pharm. Res.* **2003**, *26*, 253-257.

²⁹⁶ Moran, B. W.; Anderson, F. P.; Devery, A.; Cloonan, S.; Butler, W. E.; Varughese, S.; Draper, S. M.; Kenny, P. T. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4510-4522.

²⁹⁷ Colin, D.; Limagne, E.; Jeanningros, S.; Jacquiel, A. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2780-2788.

²⁹⁸ Regev-Shoshani, G. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 157-163.

²⁹⁹ Lu, J.; Chang, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *22*, 5744-5747.

³⁰⁰ Cardile, V. Z. *Naturforsch.* **2005**, *62*, 189-195.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

Los objetivos generales de esta Tesis son:

- a) La síntesis y evaluación biológica de compuestos relacionados con el resveratrol.
- b) La síntesis y evaluación biológica de 5-furilidentiazolonas y de 5-furilidentioxotiazolidinonas.

2.1. Objetivo 1

El primer objetivo de la Tesis, que se ha denominado como síntesis y evaluación biológica de compuestos relacionados con el resveratrol, se subdivide en los siguientes apartados:

2.1.1.a. Síntesis de estililfenoles, metoxi(estiril)bencenos y aliloxi(estiril)bencenos

La estructura general de los compuestos que se sintetizarán en este apartado, así como la del propio resveratrol, se indica en la figura 2.1.

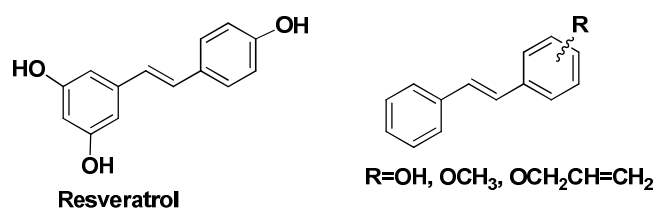


Figura 2.1. Estructura del resveratrol y de estililfenoles, metoxi(estiril)bencenos y aliloxi(estiril)bencenos.

2.1.1.b. Evaluación biológica de estililfenoles, metoxi(estiril)bencenos y aliloxi(estiril)bencenos

En este apartado se medirán las siguientes actividades biológicas de los compuestos indicados en la figura 2.1:

- 1) La citotoxicidad frente a la línea tumoral HT-29 y frente a la línea celular no tumoral BAEC.
- 2) La inhibición en la formación de tubos sobre células BAEC.
- 3) La inhibición de la secreción de la proteína VEGF.
- 4) La inhibición de la expresión del gen *VEGF*.

2.1.2.a. Síntesis de (hidroxiestiril)fenoles y (metoxiestiril)fenoles

La estructura general de los compuestos que se sintetizarán en este apartado se indica en la figura 2.2.

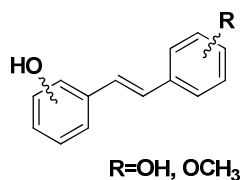


Figura 2.2. Estructura (hidroxiestiril)fenoles y (metoxiestiril)fenoles.

2.1.2.b. Evaluación biológica de (hidroxiestiril)fenoles y (metoxiestiril)fenoles

En este apartado se medirán las siguientes actividades biológicas de los compuestos indicados en la figura 2.2:

- 1) La citotoxicidad frente a las líneas tumorales HT-29 y MCF-7 y frente a las líneas celulares no tumorales HEK-293 y BAEC.
- 2) La inhibición de la migración celular sobre células BAEC.
- 3) La inhibición de la secreción de la proteína VEGF.
- 4) La inhibición de la expresión del gen *VEGF*.
- 5) La inhibición de la expresión del gen *hTERT*.
- 6) La inhibición de la expresión del gen *c-Myc*.

2.1.3.a. Síntesis de estirilanilinas y *N*-acil(estiril)anilinas

La estructura general de los compuestos que se sintetizarán en este apartado se indica en la figura 2.3.

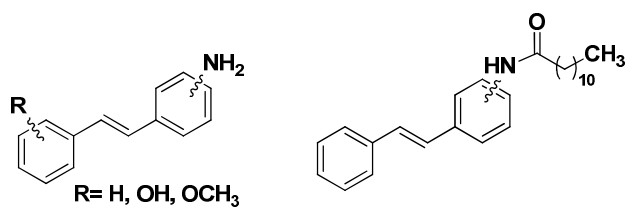


Figura 2.3. Estructura general de estirilanilinas y *N*-acil(estiril)anilinas.

2.1.3.b. Evaluación biológica de estilranilinas y *N*-acil(estiril)anilinas

En este apartado se medirán las siguientes actividades biológicas de los compuestos indicados en la figura 2.3:

- 1) La citotoxicidad frente a las líneas tumorales HT-29 y MCF-7. También se medirá la citotoxicidad en la línea celular no tumoral HEK-293.
- 2) La inhibición de la secreción de la proteína VEGF.
- 3) La inhibición de la expresión del gen *VEGF*.
- 4) La inhibición de la expresión del gen *hTERT*.
- 5) La inhibición de la expresión del gen *c-Myc*.

2.1.4.a. Síntesis de estilpiridinas y estilpirimidinas

La estructura general de los compuestos que se sintetizarán en este apartado se indica en la figura 2.4.

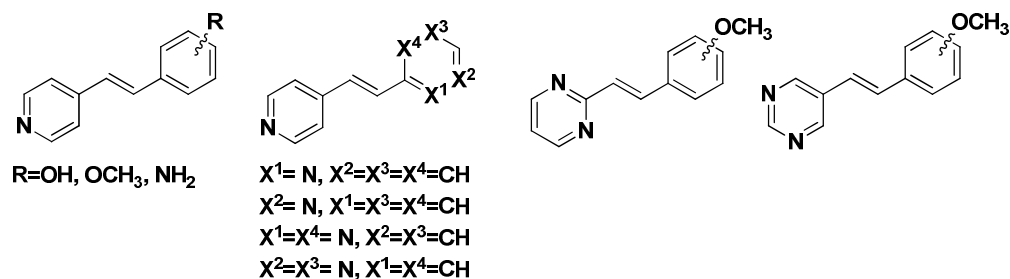


Figura 2.4. Estructura general de (hidroxiestiril), (metoxiestiril) y (aminoestiril)piridinas y de (metoxiestiril)pirimidinas.

2.1.4.b. Evaluación biológica de estilpiridinas y estilpirimidinas

En este apartado se medirán las siguientes actividades biológicas de los compuestos indicados en la figura 2.4:

- 1) La citotoxicidad frente a las líneas tumorales HT-29 y MCF-7. También se medirá la citotoxicidad en la línea celular no tumoral HEK-293.
- 2) La inhibición de la secreción de la proteína VEGF.
- 3) La inhibición de la expresión del gen *VEGF*.
- 4) La inhibición de la expresión del gen *hTERT*.
- 5) La inhibición de la expresión del gen *c-Myc*.

2.1.5.a. Síntesis de bencilidenanilinas

La estructura general de los compuestos que se sintetizarán en este apartado se indica en la figura 2.5.

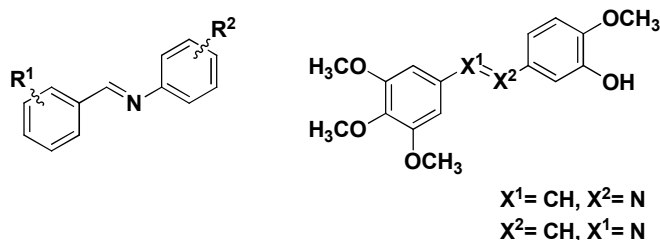


Figura 2.5. Estructura general de bencilidenanilinas.

2.1.5.b. Evaluación biológica de bencilidenanilinas

En este apartado se medirán las siguientes actividades biológicas de los compuestos indicados en la figura 2.5:

- 1) La citotoxicidad frente a las líneas tumorales HT-29 y MCF-7. También se medirá la citotoxicidad en la línea celular no tumoral HEK-293.
- 2) La inhibición de la secreción de la proteína VEGF.
- 3) La inhibición de la expresión del gen *VEGF*.
- 4) La inhibición de la expresión del gen *hTERT*.
- 5) La inhibición de la expresión del gen *c-Myc*.

2.1.6. Evaluación biológica de sulfatos, acil y glucosilderivados de resveratrol

En este apartado se medirán las siguientes actividades biológicas de los compuestos indicados en la figura 2.6:

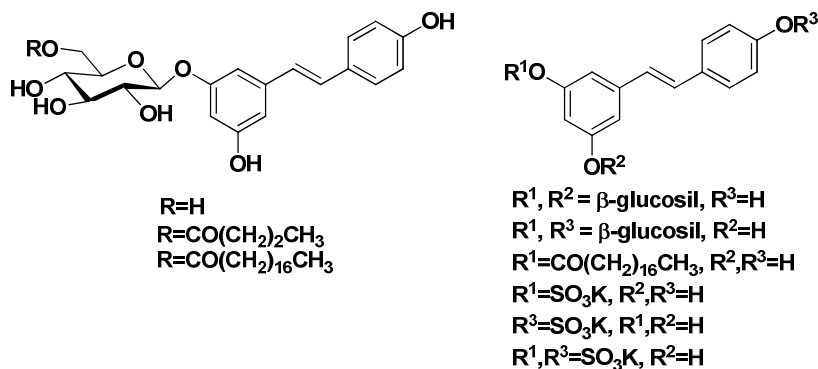


Figura 2.6. Estructuras de sulfatos, acil y glucosilderivados de resveratrol.

- 1) La citotoxicidad frente a las líneas tumorales HT-29 y MCF-7. También se medirá la citotoxicidad en la línea celular no tumoral HEK-293.
- 2) La inhibición de la secreción de la proteína VEGF.
- 3) La inhibición de la expresión del gen *hTERT*.
- 4) La inhibición de la expresión del gen *c-Myc*.

2.2. Objetivo 2

El segundo objetivo de esta Tesis síntesis se centra en:

2.2.1.a. Síntesis de 5-furilidentiazolonas y de 5-furilidentioxotiazolidinonas

Las estructuras generales de los compuestos que se sintetizarán en este apartado se indican en la figura 2.7.

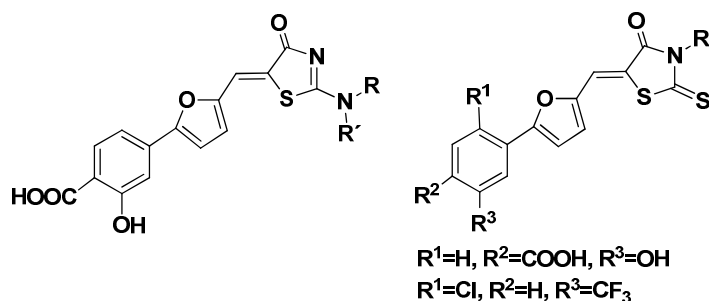


Figura 2.7. Estructuras de 5-furilidentiazolonas y de 5-furilidentioxotiazolidinonas.

2.2.1.b. Evaluación biológica de 5-furilidentiazolonas y de 5-furilidentioxotiazolidinonas

En este apartado se medirán las siguientes actividades biológicas de los compuestos indicados en la figura 2.7:

- 1) La citotoxicidad frente a las líneas tumorales HT-29 y MCF-7. También se medirá la citotoxicidad en las líneas celulares no tumorales HEK-293 y BAEC.
- 2) La inhibición de la secreción de la proteína VEGF.
- 3) La inhibición de la expresión del gen *VEGF*.
- 4) La inhibición de la expresión del gen *hTERT*.
- 5) La inhibición de la expresión del gen *c-Myc*.

CAPÍTULO 3
SÍNTESIS DE ANÁLOGOS
DE RESVERATROL

CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE RESVERATROL

3.1. Síntesis de estililfenoles, metoxi(estiril)bencenos y aliloxi(estiril)bencenos

En la figura 3.1 se indica la estructura del resveratrol y la estructura general de los estililfenoles, metoxi(estiril)bencenos y aliloxi(estiril)bencenos preparados en esta Tesis.

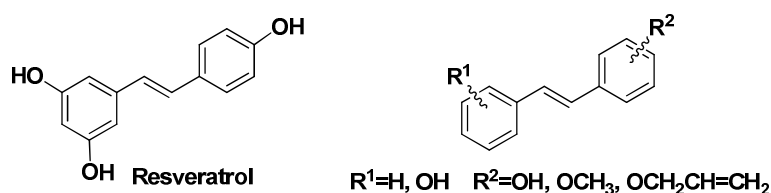
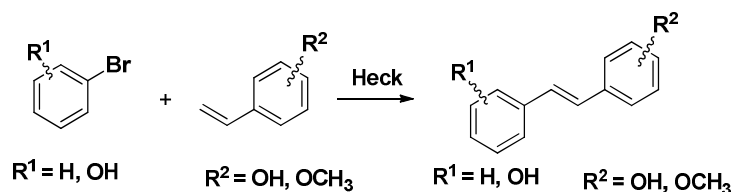


Figura 3.1. Estructura del resveratrol y de estililfenoles, metoxi(estiril)bencenos y aliloxi(estiril)bencenos.

El esquema sintético general para la preparación de estililfenoles y metoxi(estiril)bencenos se indica en el esquema 3.1 y se basa en la formación del sistema estilbénico *trans* mediante una reacción de acoplamiento de Heck entre un bromuro de arilo y un compuesto estirénico funcionalizado.



Esquema 3.1. Esquema sintético para la preparación de estililfenoles y metoxi(estiril)bencenos.

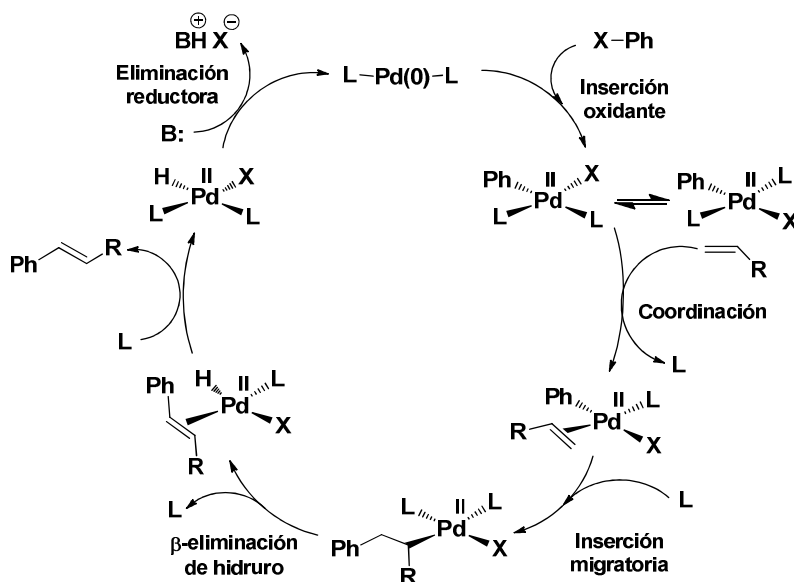
Las reacciones de formación de enlaces C-C catalizadas por paladio ocupan una posición predominante en la síntesis orgánica. Dentro de ellas cabe señalar a la reacción de Heck, la de Negishi y la de Suzuki. Estos tres científicos fueron galardonados con el premio Nobel de Química en el año 2010 por el desarrollo de este tipo de reacciones.

La reacción de Heck fue el primer ejemplo de formación de enlaces carbono-carbono usando el paladio como catalizador. La reacción fue descubierta de manera

independiente por Mirozoki y Heck a comienzos de la década de los 70 del siglo pasado. Fue Heck quien la desarrolló posteriormente, convirtiéndose en una reacción pionera que abrió el camino al desarrollo de posteriores metodologías para la formación de enlaces C-C.³⁰¹

En la reacción de Heck se lleva a cabo un acoplamiento entre una olefina, que actúa como componente nucleofílico y, usualmente, un haluro de arilo, poco reactivo en reacciones de sustitución nucleofílica, que actúa como componente electrofílico.

El ciclo catalítico de la reacción de Heck requiere paladio en estado de oxidación (0), por lo que en la reacción se emplean complejos de paladio en este estado de oxidación o compuestos de Pd(II) que se reducen a Pd(0) *in situ*. En el esquema 3.2 se describe el esquema general del ciclo catalítico de la reacción de Heck.³⁰²



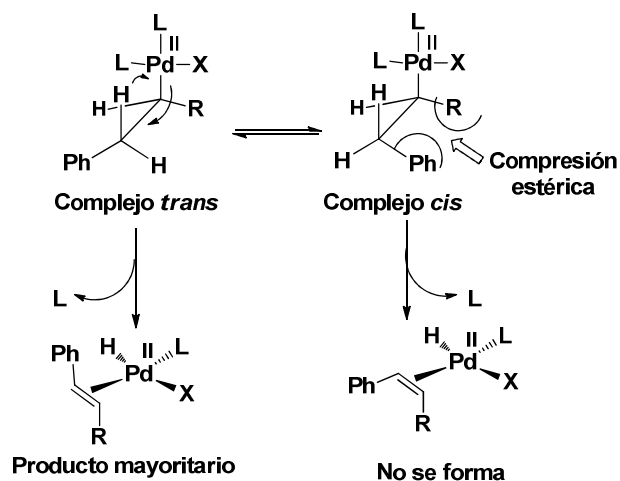
Esquema 3.2. Ciclo catalítico general de la reacción de Heck.

La estereoselectividad *E* de la reacción de Heck tiene lugar en la etapa de β-eliminación de hidruro. Así, el complejo que resulta del proceso de inserción

³⁰¹ (a) Heck, R. F. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 146-151. (b) Daves, G. D.; Hallberg, A. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1433-1445. (c) Cabri, W.; Candiani, I. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 2-7. (d) Beletskaya, I. P.; Cheprakov, A. V. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3009-3066. (e) Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4442-4489. (f) Zeni, G.; Larock, R. C. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4644-4680.

³⁰² Crisp, G. T. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 427-436.

migratoria puede adquirir las dos conformaciones que se dibujan en el esquema 3.3. El proceso de eliminación de hidruro es de tipo *sin*, con el hidruro y la parte de paladio colocados en el mismo lado. Cuando se produce la eliminación en el confórmero *trans*, el fenilo y el grupo R se encuentran en una posición de máxima separación y el estado de transición asociado a este complejo es menos energético que el que se genera a partir del complejo *cis*, que coloca al fenilo y al grupo R en una posición de interferencia estérica debido a su proximidad espacial (véase el esquema 3.3).



Esquema 3.3. Formación predominante del isómero E en la reacción de Heck.

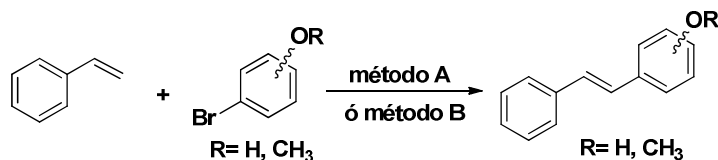
3.1.1. Síntesis de estililfenoles y metoxi(estiril)bencenos

La preparación de los estililfenoles y metoxi(estiril)bencenos se llevó a cabo mediante la aplicación de dos métodos experimentales (véase el esquema 3.4). En el primero de ellos, denominado en esta Tesis como método A, la reacción se efectuaba calentando a 170°C (irradiación con microondas de 70 W),³⁰³ durante 10 minutos, una mezcla formada por estireno (2 mmol), el correspondiente bromuro de arilo (1 mmol), K₂CO₃ (3.7 mmol), bromuro de tetra-*n*-butilamonio (TBAB, 1 mmol) y Pd(0) (200 ppm) en agua (1.6 mL).³⁰⁴ El segundo procedimiento experimental, denominado

³⁰³ Para una revisión sobre el uso de microondas en síntesis orgánica véase: (a) Lindström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9225-9283. (b) Kappe, C. O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6250-6284. (c) Surati, M. A.; Jauhari, S.; Desai, K. *Arch. Appl. Sci. Res.* **2012**, 4, 645-661.

³⁰⁴ Arvela, R. K.; Leadbeater, N. E. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1786-1790.

método B, se llevaba a cabo calentando a 140°C, durante 24 horas, una mezcla formada por estireno (1.5 mmol), el correspondiente yoduro de arilo (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.015 mmol), Bu₃N (2 mmol) y TBAB (1 mmol) en agua (3 mL).³⁰⁵



Esquema 3.4. Método A: estireno (2 mmol), bromuro de arilo (1 mmol), Pd (0) (200 ppm), K₂CO₃ (3.7 mmol), TBAB (1 mmol), H₂O, 170°C (MW 70 W), 10 min. **Método B:** estireno (1.5 mmol), yoduro de arilo (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.015 mmol), Bu₃N (2 mmol), TBAB (1 mmol), H₂O, 140°C, 24 h.

En la tabla 3.1 se indican los procedimientos empleados y los rendimientos obtenidos en la preparación de una serie de estilfenoles y metoxi(estiril)bencenos.

Tabla 3.1. Estirilfenoles y metoxi(estiril)bencenos sintetizados

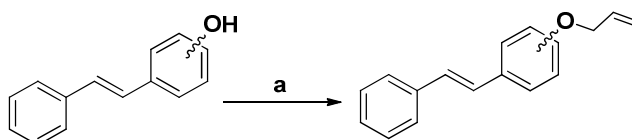
Código	Producto	Método A (%)	Método B (%)
I.1		63%	86%
I.2		68%	65%
I.3		26%	97%
I.4		81%	65%
I.5		--	21% (48 h de reacción)

³⁰⁵ (a) Jeffery, T. *Tetrahedron* **1996**, 52, 10113-10130. (b) Huan, S.; Chen, J.-R.; Tsai, F.-Y. *Molecules* **2010**, 15, 315-330.

I.6		88%	78%
-----	--	-----	-----

3.1.2. Síntesis de aliloxi(estiril)bencenos

Aprovechando la obtención de los estililfenoles **I.1-I.3** se prepararon, mediante reacción de *O*-alilación, los aliloxi(estiril)bencenos que se indican en la tabla 3.2. La reacción se llevó a cabo calentando a reflujo los estililfenoles en acetona en presencia de carbonato potásico y de bromuro de alilo (véase el esquema 3.5).³⁰⁶ Estas condiciones de reacción no permitieron la alilación del 3-estirilfenol, que se pudo obtener utilizando NaH como base, en lugar de carbonato potásico.



Esquema 3.5. (a) estililfenol (1 mmol), BrCH₂CH=CH₂ (3 mmol), K₂CO₃ (3 mmol) (para el 1-aliloxi-3-estirilbenceno NaH, 3 mmol), acetona, 65°C, 24 h.

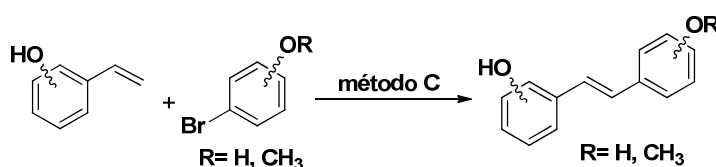
Tabla 3.2. Aliloxi(estiril)bencenos sintetizados

Código	Producto	Rto. (%)
I.7		79%
I.8		85%
I.9		90%

³⁰⁶ Gardner, R. A.; Kindake, R.; Wang, C.; Phanstiel, O. J. *Org. Chem.* **2004**, 69, 3530-3537.

3.1.3. Síntesis de (hidroxiestiril)fenoles y (metoxiestiril)fenoles

La siguiente batería de derivados estilbénicos se obtuvo mediante reacción de Heck de vinilfenoles con bromofenoles y con bromoanisoles. En primer lugar se ensayaron los métodos de acoplamiento A y B descritos previamente, sin embargo estos procedimientos experimentales no permitieron en ningún caso la obtención de los correspondientes estilbenos. La reacción de acoplamiento, a la que se ha denominado método C, se consiguió calentando a 180°C (irradiación con microondas a 150 W de potencia) durante 3 horas una mezcla formada por el hidroxiestireno (1.5 mmol), el correspondiente bromuro de arilo (1 mmol), piperidina (3.65 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (0.03 mmol) en DMF (2 mL) (véase el esquema 3.6).³⁰⁷



Esquema 3.6. Método C: hidroxiestireno (1.5 mmol), bromuro de arilo (1 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0.03 mmol), piperidina (3.65 mmol), DMF, 180°C (MW 150 W), 3 h.

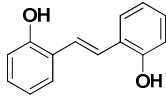
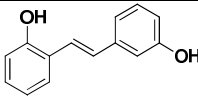
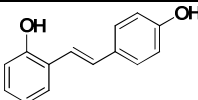
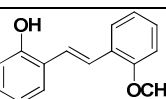
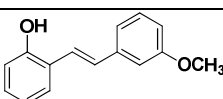
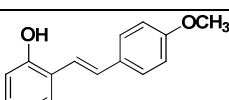
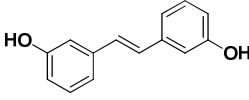
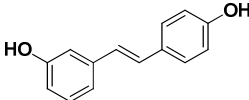
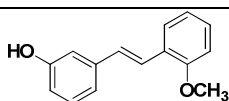
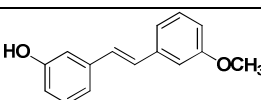
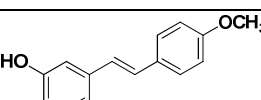
Los vinilfenoles necesarios para el acoplamiento anterior no eran comerciales y se prepararon a partir de los correspondientes hidroxibenzaldehídos mediante reacción de olefinación de Wittig (véase la parte experimental).³⁰⁸

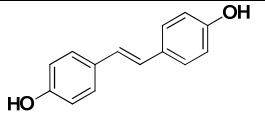
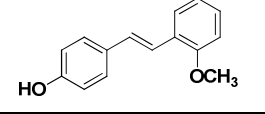
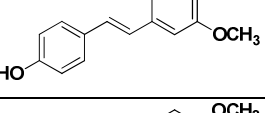
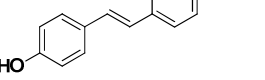
En la tabla 3.3 se indican los rendimientos obtenidos en la preparación de una serie de (hidroxiestiril)fenoles y (metoxiestiril)fenoles.

³⁰⁷ Sharma, N.; Mohanakrishnan, D.; Shard, A.; Sharma, A.; Sinha, A. K.; Sahal, D. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 297-311.

³⁰⁸ Albert, S.; Horbach, R.; Deising, H. B.; Siewert, B.; Csuk, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5155-5166.

Tabla 3.3. (Hidroxiestiril)fenoles y (metoxiestiril)fenoles sintetizados

Código	Producto	Método C (%)
I.10		61%
I.11		62%
I.12		67%
I.13		56%
I.14		76%
I.15		52%
I.16		81%
I.17		88%
I.18		85%
I.19		71%
I.20		72%

I.21		64%
I.22		53%
I.23		62%
I.24		50%

3.2. Síntesis de estirilanolinas

3.2.1. Síntesis de estirilanolinas, (hidroxiestiril)anolinas y (metoxiestiril)anolinas

Como se ha explicado en el capítulo de introducción, uno de los inconvenientes que presenta el resveratrol en el ámbito farmacéutico es su baja biodisponibilidad, debido a la presencia en su estructura de grupos hidroxilo que permiten su eliminación mediante glucuronconjugación o sulfonación.³⁰⁹

Aunque la formación de sulfonatos es común a partir de compuestos con grupos funcionales amino, la glucuronación de aminas es mucho menos usual que la glucuronación de fenoles. Por esta razón se decidió la preparación de estirilanolinas, (hidroxiestiril)anolinas y (metoxiestiril)anolinas.

La síntesis de esta clase de compuestos mediante aplicación de los métodos A ó B no funcionó. El método C resultó más apropiado y algunas (hidroxiestiril)anolinas se pudieron obtener mediante aplicación de este método. Sin embargo, el fallo de este método en la síntesis de muchas de las (hidroxiestiril)anolinas y (metoxiestiril)anolinas proyectadas nos obligó a buscar otros métodos de acoplamiento. Los tres métodos

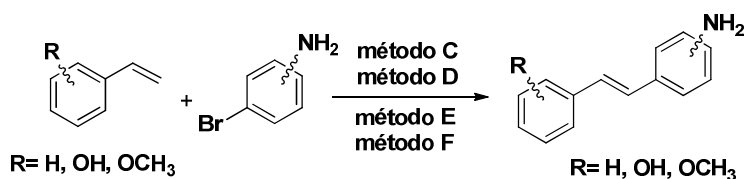
³⁰⁹ (a) Cottart, C.-H.; Nivet-Antoine, V.; Laguillier-Morizot, C.; Beaudeau, J. L. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, 54, 7-16. (b) Amri, A.; Chaumeil, J. C.; Sfar, S.; Charrueau, C. *J. Contr. Release* **2012**, 158, 182-193.

que se utilizaron para la síntesis de la mayoría de este tipo de estilbenos se han denominado como D, E y F y se describen brevemente a continuación.

El método D se puede considerar una adaptación a condiciones de microondas del método B. En este procedimiento una mezcla formada por el estireno (1 mmol), la correspondiente bromoanilina (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.01 mmol), Bu_3N (1.2 mmol) y TBAB (1.2 mmol) se calentaba en agua a 140°C (irradiación con microondas a 70 W) durante 1.5 horas (véase el esquema 3.7).³⁰⁵

El método E es una adaptación del método D y se utilizó cuando este método D no funcionaba bien. En el método E se calentaba una mezcla formada por el estireno (1 mmol), la correspondiente bromoanilina (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.04 mmol) y piperidina (1.5 mmol) en DMF a 140°C (irradiación con microondas a 70 W) durante 1.5 horas (véase el esquema 3.7).^{305,307}

El método F es una variante del método E, con cambios en la base y en la temperatura. El método F se utilizó cuando el E no funcionaba correctamente. En el método F se calentaba una mezcla formada por el estireno (1 mmol), la correspondiente bromoanilina (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.005 mmol) y K_2CO_3 (2 mmol) en DMF a 175°C (irradiación con microondas a 25 W) durante 30 minutos (véase el esquema 3.7).³¹⁰

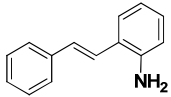
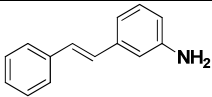
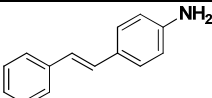
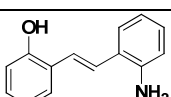
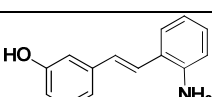
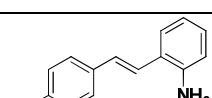
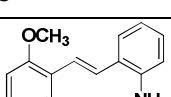
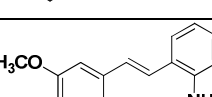
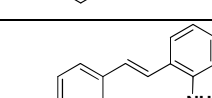
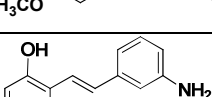
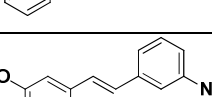


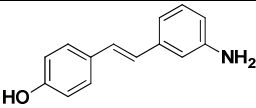
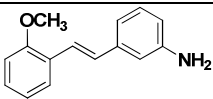
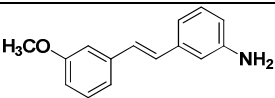
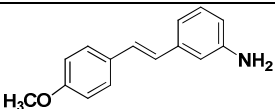
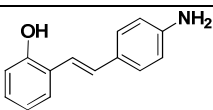
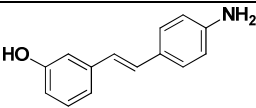
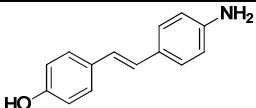
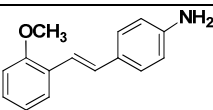
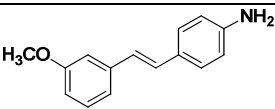
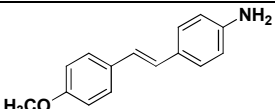
Esquema 3.7. Método C: hidroxiestireno (1.5 mmol), bromoanilina (1 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.03 mmol), piperidina (3.65 mmol), DMF, 180°C (MW 150 W), 3 h. **Método D:** hidroxiestireno (1 mmol), bromoanilina (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.01 mmol), Bu_3N (1.2 mmol), TBAB (1.2 mmol), H_2O , 140°C (MW 70 W), 1.5 h. **Método E:** estireno (1 mmol), bromoanilina (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.04 mmol), piperidina (1.5 mmol), DMF, 140°C (MW 70 W), 1.5 h. **Método F:** derivado estirénico (1 mmol), bromoanilina (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.005 mmol), K_2CO_3 (2 mmol), DMF, 175°C (MW 25 W), 30 min.

En la tabla 3.4 se indican los procedimientos empleados y los rendimientos obtenidos en la preparación de una serie de estilranilinas.

³¹⁰ Kormos, C. M.; Leadbeater, N. E. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3854-3858.

Tabla 3.4. Estirilanolinas, (hidroxiestiril)anolinas y (metoxiestiril)anolinas sintetizadas

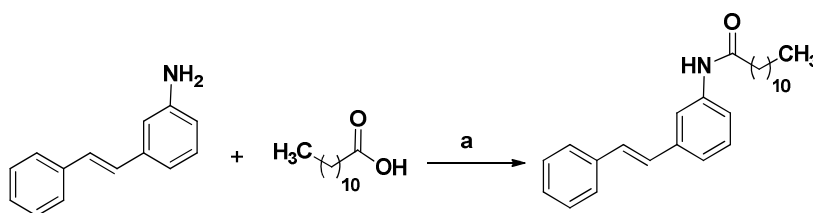
Código	Producto	Método (%)
I.25		E (75%)
I.26		E (69%)
I.27		E (68%)
I.28		C (64%)
I.29		C (62%)
I.30		E (51%)
I.31		F (72%)
I.32		F (69%)
I.33		F (59%)
I.34		C (70%)
I.35		D (74%)

I.36		C (75%)
I.37		F (71%)
I.38		F (73%)
I.39		F (71%)
I.40		E (39%)
I.41		D (68%)
I.42		E (52%)
I.43		F (74%)
I.44		F (45%)
I.45		F (55%)

3.2.2. Síntesis de *N*-acil(estiril)anilinas

Las amidas, al igual que las aminas, tienen muy poca tendencia a formar glucuronatos pero, a diferencia de las aminas, tampoco pueden formar sulfonatos, por lo que se consideró adecuado preparar amidas derivadas de algunas estiliranilinas descritas en la sección precedente. Las amidas que se pensó preparar deberían contener largas cadenas hidrocarbonadas, a fin de simular a los ácidos grasos, aumentando de este modo su lipofilia y facilidad de entrada en las células.

La reacción de amidación con ácido dodecanoico se ensayó sobre las estiliranilinas **1.25**, **1.26** y **1.27**. Se ensayaron diferentes reactivos de acoplamiento peptídico como el carbonildiimidazol (CDI), la diciclohexilcarbodiimida (DCC) y la *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ),³¹¹ pero las reacciones no funcionaron, recuperándose los productos de partida en todos los casos. La única reacción de amidación que funcionó se consiguió al tratar el ácido dodecanoico con clorosulfonilisocianato y trietilamina en diclorometano, seguido de adición de la 3-estiliranilina **1.26** a la mezcla de reacción (véase el esquema 3.8).³¹²



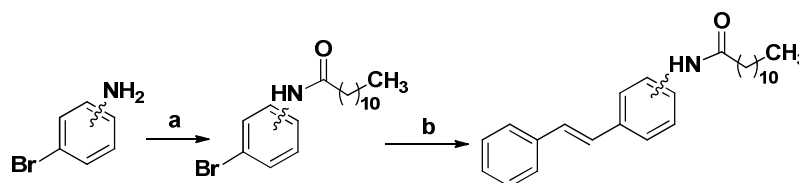
Esquema 3.8. (a) ácido dodecanoico (1 mmol), Et₃N (1,05 mmol), ClSO₂NCO (1 mmol), CH₂Cl₂, 0°C, 3 h; luego 3-estiliranilina (2 mmol), t.a., 16 h (64%).

Este procedimiento de amidación no funcionaba sobre la 2-estiliranilina ni sobre la 4-estiliranilina, muy probablemente debido a la baja nucleofilia de los átomos de nitrógeno, debido a la eficiente deslocalización del par electrónico libre sobre el sistema estilbénico.

Las amidas derivadas de la 2-estiliranilina y de la 4-estiliranilina se obtuvieron mediante la secuencia sintética que se indica en el esquema 3.9.

³¹¹ Para una revisión de los métodos de formación de amidas y de acoplamiento peptídico véase: (a) Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467. (b) Albericio, F. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 211-221. (c) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852. (d) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. J. *Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 97-116.

³¹² Keshavamurthy, K. S.; Vankar, Y. D.; Dhar, D. N. *Synthesis* **1982**, *6*, 506-508.



Esquema 3.9. (a) ácido dodecanoico (1 mmol), Et₃N (1,05 mmol), ClSO₂NCO (1 mmol), CH₂Cl₂, 0°C, 3 h; luego bromoanilina (2 mmol), t.a., 16 h (*N*-(2-bromofenil)dodecanamida 60%, *N*-(4-bromofenil)dodecanamida 62%); (b) método de acoplamiento E: estireno (1 mmol), bromoamidoanilina (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.04 mmol), piperidina (1.5 mmol), DMF, 140°C (MW 70 W), 1.5 h (*N*-(2-estirilfenil)dodecanamida 55%, *N*-(4-estirilfenil)dodecanamida 58%).

En la tabla 3.5 se indican los rendimientos totales obtenidos en la síntesis de las *N*-acil(estiril)anilinas.

Tabla 3.5. *N*-acil(estiril)anilinas sintetizadas

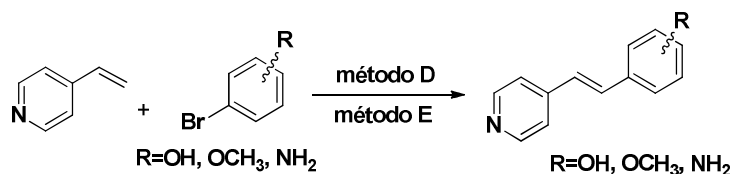
Código	Producto	Rto. Global (%)
I.46		33%
I.47		44%
I.48		36%

3.3. Síntesis de estirilpiridinas y estirilpirimidinas

3.3.1. Síntesis de 4-(hidroxiestiril), 4-(metoxiestiril) y 4-(aminoestiril)piridinas

Otros compuestos sintetizados en esta Tesis contenían un átomo de nitrógeno en uno de los anillos aromáticos. Los primeros de esta clase de compuestos en ser preparados fueron las 4-(hidroxiestiril), 4-(metoxiestiril) y 4-(aminoestiril)piridinas. Estos compuestos se prepararon mediante reacciones de acoplamiento tipo Heck

entre la 4-vinilpiridina y los correspondientes bromofenoles, bromometoxibencenos y bromoanilinas, empleándose para ello los métodos de acoplamiento descritos en apartados precedentes, tal y como se indica en el esquema 3.10.

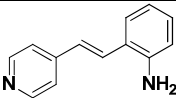
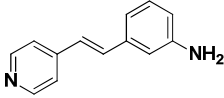
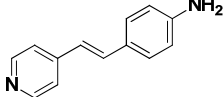


Esquema 3.10. Método D: 4-vinilpiridina (1 mmol), bromuro de arilo (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.01 mmol), Bu_3N (1.2 mmol), TBAB (1.2 mmol), H_2O , 140°C (MW 70 W), 1.5 h. **Método E:** 4-vinilpiridina (1 mmol), bromuro de arilo (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.04 mmol), piperidina (1.5 mmol), DMF, 140°C (MW 70 W), 1.5 h.

En la tabla 3.6 se indican los procedimientos empleados y los rendimientos obtenidos en la preparación de esta clase de compuestos.

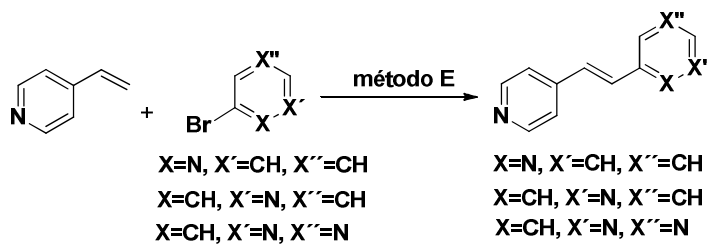
Tabla 3.6. 4-(hidroxiestiril), 4-(metoxiestiril) y 4-(aminoestiril)piridinas sintetizadas

Código	Producto	Método (%)
II.1		E (45%)
II.2		E (47%)
II.3		E (40%)
II.4		D (80%)
II.5		D (79%)
II.6		D (78%)

II.7		E (71%)
II.8		E (72%)
II.9		E (61%)

3.3.2. Síntesis de (*E*)-1-(2-piridil)-2-(4-piridil)etileno, (*E*)-1-(3-piridil)-2-(4-piridil)etileno y (*E*)-1-(5-pirimidin)-2-(4-piridil)etileno

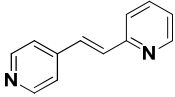
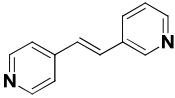
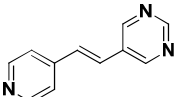
La síntesis de (*E*)-1-(2-piridil)-2-(4-piridil)etileno, (*E*)-1-(3-piridil)-2-(4-piridil)etileno y (*E*)-1-(5-pirimidin)-2-(4-piridil)etileno se llevó a cabo mediante acoplamiento de Heck (método E) de la 4-vinilpiridina con la 2-bromopiridina, con la 3-bromopiridina y con la 5-bromopirimidina, respectivamente (esquema 3.11).



Esquema 3.11. Método E: 4-vinilpiridina (1 mmol), bromocompuesto (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.04 mmol), piperidina (1.5 mmol), DMF, 140°C (MW 70 W), 1.5 h.

En la tabla 3.7 se indican los rendimientos obtenidos en la preparación de estos compuestos.

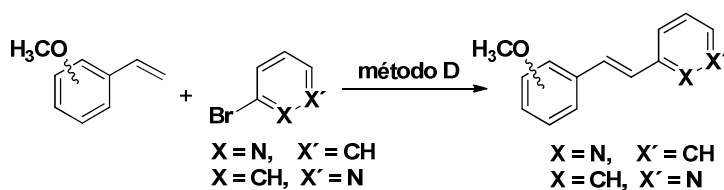
Tabla 3.7. (*E*)-1-(2-piridil)-2-(4-piridil)etileno, (*E*)-1-(3-piridil)-2-(4-piridil)etileno y (*E*)-1-(5-pirimidin)-2-(4-piridil)etileno

Código	Producto	Método E (%)
II.10		54%
II.11		64%
II.12		52%

3.3.3. Síntesis de 2-(metoxiestiril) y 3-(metoxiestiril)piridinas

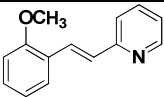
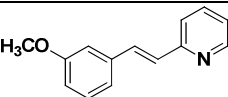
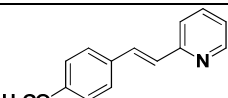
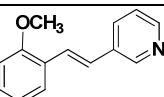
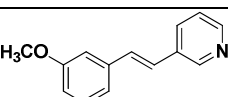
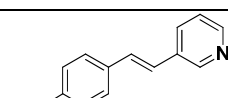
Durante el desarrollo de esta Tesis se fueron simultaneando los trabajos de preparación sintética con los de evaluación biológica. Como se explicará en el siguiente capítulo, la medición de las actividades biológica de las 4-(hidroxiestiril), 4-(metoxiestiril) y 4-(aminoestiril)piridinas permitió comprobar que los compuestos más activos eran los que contenían grupos metoxilo en sus estructuras, razón por la cual se decidió descartar la preparación de 2-(hidroxiestiril) y 2-(aminoestiril)piridinas así como la de 3-(hidroxiestiril) y 3-(aminoestiril)piridinas, y enfocar los esfuerzos sintéticos a la preparación de 2-(metoxiestiril) y 3-(metoxiestiril)piridinas así como de 2-(metoxiestiril) y 5-(metoxiestiril)pirimidinas.

En la síntesis de las (metoxiestiril)piridinas se emplearon metoxivinilbencenos como componentes nucleofílicos y bromopiridinas como componentes electrofílicos en el acoplamiento de Heck, el cual se llevó a cabo empleando el método D, tal y como se indica en el esquema 3.12.

**Esquema 3.12. Método D:** metoxivinilbenceno (1 mmol), bromopiridina (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.01 mmol), Bu_3N (1.2 mmol), TBAB (1.2 mmol), H_2O , 140°C (MW 70 W), 1.5 h.

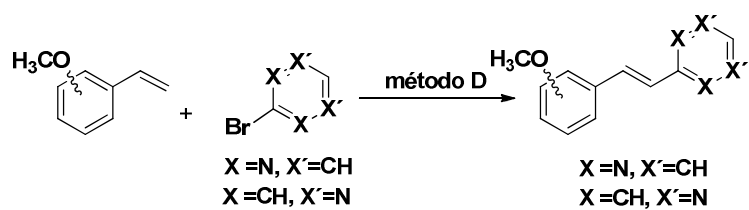
En la tabla 3.8 se indican los rendimientos obtenidos en la preparación de estos compuestos.

Tabla 3.8. 2-(metoxiestiril) y 3-(metoxiestiril)piridinas sintetizadas

Código	Producto	Método D (%)
II.13		65%
II.14		67%
II.15		61%
II.16		78%
II.17		79%
II.18		82%

3.3.4. Síntesis de 2-(metoxiestiril) y 5-(metoxiestiril)pirimidinas

Para la síntesis de 2-(metoxiestiril)pirimidinas y 5-(metoxiestiril)pirimidinas se emplearon metoxivinilbencenos como componentes nucleofílicos y 2-bromopirimidina y 5-bromopirimidina como componentes electrofílicos en el acoplamiento de Heck, el cual se llevó a cabo empleando el método D, tal y como se indica en el esquema 3.13.



Esquema 3.13. Método D: metoxivinilbenceno (1 mmol), bromopirimidina (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.01 mmol), Bu₃N (1.2 mmol), TBAB (1.2 mmol), H₂O, 140°C (MW 70 W), 1.5 h.

En la tabla 3.9 se indican los rendimientos obtenidos en la preparación de estos compuestos.

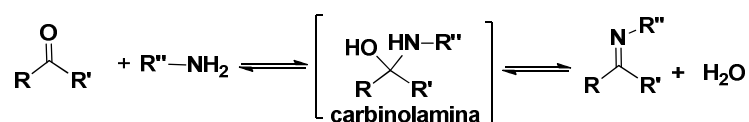
Tabla 3.9. 2-(metoxiestiril) y 5-(metoxiestiril)pirimidinas sintetizadas

Código	Producto	Método D (%)
II.19		64%
II.20		60%
II.21		51%
II.22		62%
II.23		59%
II.24		60%

3.4. Síntesis de bencilidenanilinas

El último objetivo sintético se centró en la preparación de iminas relacionadas con resveratrol. La reacción de condensación de iminas con aldehídos o cetonas es una de las más antiguas y empleadas en química orgánica. Esta reacción también juega un papel crucial en algunas de las reacciones bioquímicas, como por ejemplo en las reacciones de transaminación que emplean fosfato de piridoxal como cofactor.

Mecanísticamente, la formación de iminas consta de dos pasos. En el primero de ellos se produce la adición nucleofílica de la amina al carbono carbonílico del aldehído o la cetona, dando lugar a un intermedio hemiaminal (carbinolamina). Este intermedio experimenta la eliminación de una molécula de agua para formar la imina o base de Schiff (véase el esquema 3.14).³¹³



Esquema 3.14. Formación de iminas.

El equilibrio de la reacción favorece habitualmente a los reactivos (la amina y el aldehído o cetona), por lo que, en muchos casos, se hace necesaria la eliminación del agua del medio de reacción a fin de desplazar el equilibrio hacia la formación de los productos. Este proceso de deshidratación se lleva a cabo, usualmente, mediante destilación azeotrópica³¹⁴ o mediante la adición de agentes deshidratantes en el seno de la reacción.³¹⁵

En uno de los métodos que empleamos en la preparación de las iminas, que hemos denominado método G, el aldehído y a la amina se agitaban a temperatura ambiente en etanol.³¹⁶ En otro método, que hemos denominado método H, el aldehído y a la amina se calentaban en tolueno en presencia de tamices

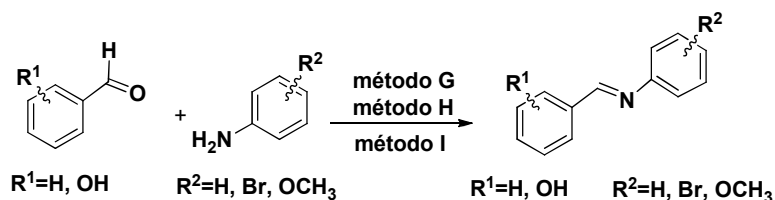
³¹³ Hugo Schiff fue el primer científico en describir la formación de este tipo de bases: Schiff, H. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie* **1864**, 131, 118-119.

³¹⁴ (a) White, W. A.; Weingarten, H. *J. Org. Chem.* **1967**, 32, 213-214. (b) Castellano, J. A.; Goldmacher, J. E.; Barton, L. A.; Kane, J. S. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 3501. (c) Taguchi, K.; Westheimer, F. H. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 1570-1572. (d) Texier-Boullet, F. *Synthesis* **1985**, 6-7, 679-681.

³¹⁵ UC Davis ChemWiki by University of California. Consultado el 17 de Abril de 2013.

³¹⁶ Tripodi, F.; Pagliarin, R.; Fumagalli, G.; Bigi, A.; Fusi, P.; Orsini, F.; Frattini, M.; Coccetti, P. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 2112-2124.

moleculares.³¹⁷ En un tercer método, que hemos denominado método I, el aldehído y la amina se agitaban a temperatura ambiente en agua. Este método contraintuitivo, ya que en él se emplea agua como disolvente, ha sido descrito por Tanaka y Shiraishi y no requiere de ningún catalizador ni agente deshidratante (véase el esquema 3.15).³¹⁸



Esquema 3.15. Método G: benzaldehído (1 mmol), anilina (1 mmol), EtOH, t.a., 5 h. **Método H:** benzaldehído (1 mmol), anilina (1 mmol), tolueno, tamices moleculares 3 Å, t.a., 24 h. **Método I:** hidroxibenzaldehído (1 mmol), anilina (1 mmol), H₂O, t.a., 4 h.

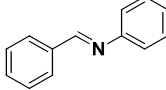
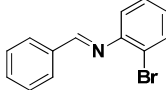
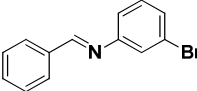
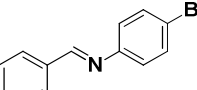
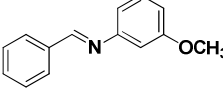
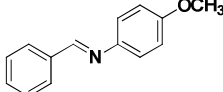
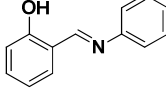
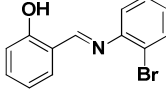
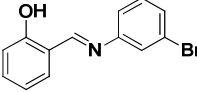
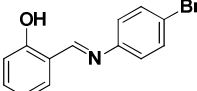
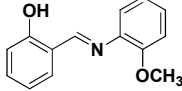
En todos los casos se intentó sintetizar el compuesto mediante el método I, y en aquellos casos en los que la reacción no avanzaba al 100% se probó el método G y, por último, cuando ninguno de los dos métodos anteriores funcionaba, se utilizó el método H. Cabe señalar que ni la *N*-benziliden-2-metoxianilina ni la *N*-(2-metoxibenziliden)-3-hidroxianilina se lograron obtener de manera pura con ninguna de las metodologías ensayadas, ya que siempre aparecían mezcladas con producto de partida, no pudiéndose purificar con lavados ni con cromatografía, revertiendo en todos los casos la reacción hacia los materiales de partida.

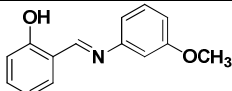
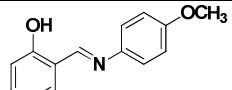
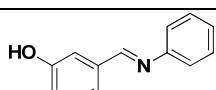
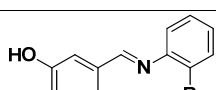
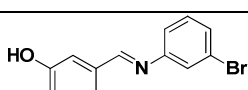
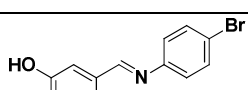
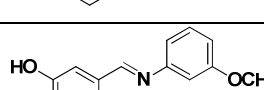
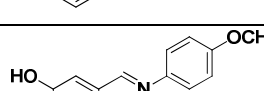
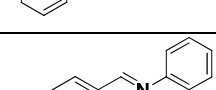
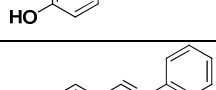
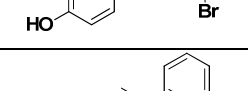
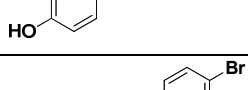
En la tabla 3.10 se indican las estructuras de las iminas sintetizadas así como el método de condensación empleado y el rendimiento obtenido. En la tabla también se incluyen dos iminas, que no responden a la estructura general indicada más arriba, y que se obtuvieron por condensación del 3,4,5-trimetoxibenzaldehído con 3-hidroxi-4-metoxianilina y por condensación de la 3,4,5-trimetoxianilina con 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído, respectivamente.

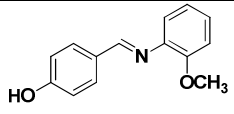
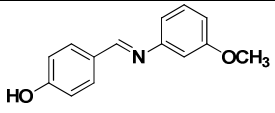
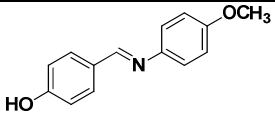
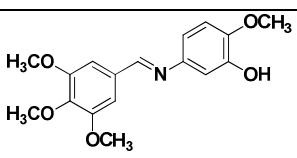
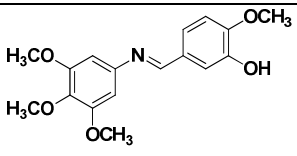
³¹⁷ Schneekloth, J. S. Jr.; Kim, J.; Sorensen, E. J. *Tetrahedron* **2009**, 65, 3096-3101.

³¹⁸ Tanaka, K.; Shiraishi, R. *Green Chem.* **2000**, 2, 272-273.

Tabla 3.10. Bencilidenanilinas sintetizadas

Código	Producto	Método (R%)
III.1		G (99%)
III.2		H (34%)
III.3		G (99%)
III.4		G (99%)
III.5		H (99%)
III.6		G (52%)
III.7		I (67%)
III.8		I (92%)
III.9		I (95%)
III.10		I (70%)
III.11		H (99%)

III.12		H (99%)
III.13		I (84%)
III.14		H (61%)
III.15		H (79%)
III.16		I (62%)
III.17		I (41%)
III.18		H (20%)
III.19		I (58%)
III.20		I (55%)
III.21		H (42%)
III.22		I (54%)
III.23		I (88%)

III.24		G (39%)
III.25		H (45%)
III.26		I (56%)
III.27		G (52%)
III.28		G (42%)

3.5. Experimental

3.5.1. Técnicas generales

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fueron registrados, en general, en un espectrómetro Varian Unity 500 (frecuencias aproximadas de operación 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C). Las asignaciones de las señales y la determinación de la multiplicidad de los carbonos se han llevado a cabo mediante correlaciones heteronucleares bidimensionales (HSQC y COSY). Los desplazamientos químicos están indicados en δ (ppm) y se efectuaron en CDCl_3 marcado con trimetilsilano como disolvente, utilizando las señales de éste último como referencia, CD_3OD o $\text{DMSO}-d_6$.

Los espectros de masas se midieron utilizando un espectrómetro VG AutoSpec con fuente de ionización de impacto electrónico (EIMS, 70 eV) y un espectrómetro Q-TOF Waters con fuente de ionización combinada de tipo electrospray y APCI con diseño Z-spray (ESMS). La tensión capilar de 3,5 kV se utilizó en el sentido positivo, o en sentido negativo para determinados casos, y la tensión de cono se estableció en 20 V.

Los espectros de IR se obtuvieron mediante el uso de pastillas de KBr en un espectrómetro Jasco FT/IR-6200, abarcando la región $4.000\text{--}6.000\text{ cm}^{-1}$. Solo se indican las bandas de funciones relevantes (OH, NH_2 , NH, C=O, C=N).

Para la cromatografía de capa fina se utilizaron cromatofolios de gel de sílice de Merck 5554.

Los disolventes tetrahidrofurano y diclorometano se secaron antes de su uso por medio de un sistema de purificación de disolventes MBRAUN modelo MB-SPS-800 series. La trietilamina se destiló sobre hidróxido potásico. La *N,N*-dimetilformamida se destiló sobre CaH_2 y se guardó sobre tamices de 3 Å.

Los reactivos disponibles comercialmente se utilizaron sin tratamiento previo, directamente de Aldrich, Fluka o Acros.

Los reactivos sensibles al aire se utilizaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno evitando en todo momento el contacto con el aire y la humedad.

3.5.2. Reacciones de Heck

Método A³⁰⁴

En un tubo de microondas se introdujo el bromoderivado (1 mmol), estireno (0.23 mL, 2 mmol), K_2CO_3 (0.511 g, 3.7 mmol), TBAB (0.322 g, 1 mmol), 0.4 mL de una disolución comercial de paladio (1000 ppm de concentración) y agua (1.6 mL), para dar un volumen total de 2 mL quedando una concentración de 200 ppm de paladio. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos bajo radiación con microondas a una temperatura de 170°C y una potencia de 70 W. Luego, la mezcla de reacción se vertió sobre 30 mL de agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 . Después de evaporar el disolvente bajo presión reducida, el residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano/AcOEt como eluyente proporcionando el compuesto de interés.

Método B³⁰⁵

En un matraz de fondo redondo se introdujo el correspondiente yodoarilo (1 mmol), estireno (0.18 mL, 1.5 mmol), tributilamina (0.48 mL, 2 mmol), TBAB (0.322 g, 1 mmol) y agua (4 mL). Se agitó la mezcla hasta alcanzar la homogeneidad y se añadió $Pd(NH_3)_2Cl_2$ (3 mg, 0.015 mmol). La mezcla se calentó a reflujo (140°C) durante 24 horas. Tras su enfriamiento se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 . Después de evaporar el disolvente bajo presión reducida, el residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano/AcOEt como eluyente proporcionando el compuesto de interés.

Método C³⁰⁷

En un tubo de microondas se introdujo el correspondiente bromoderivado (1 mmol), el derivado estirénico (1.5 mmol), piperidina (0.36 mL, 3.65 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (0.035 g, 0.03 mmol) y DMF (2 mL). Se añadió LiCl (0.0034 g, 0.08 mmol) en los casos requeridos. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas bajo irradiación con microondas a una temperatura de 180°C y una potencia de 150 W. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró sobre celite. El filtrado se vertió sobre agua acidificada (50 mL de agua acidificada con HCl hasta pH 5-6) o agua basificada en el caso de los compuestos con grupos amino (50 mL de agua basificada con NaOH hasta pH 8-9) y se extrajo con éter (3 x 40 mL). Los extractos orgánicos se

lavarón con NH_4Cl acuoso (20 mL), agua (20 mL) y salmuera (20 mL) y se secaron sobre Na_2SO_4 . Después de evaporar el disolvente bajo presión reducida, el residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano/ AcOEt como eluyente proporcionando el compuesto de interés.

Método D³⁰⁵

En un tubo de microondas se introdujo el correspondiente bromofenol (1 mmol), el derivado estirénico (1 mmol), tributilamina (0.22 mL, 1.2 mmol), TBAB (0.387 g, 1.2 mmol) y agua (3 mL). Se agitó la mezcla hasta alcanzar la homogeneidad y se añadió $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (2 mg, 0.01 mmol). La mezcla se agitó durante 1 hora bajo irradiación con microondas a una temperatura de 140°C y una potencia de 70 W. Tras su enfriamiento se diluyó con agua (10 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 . Después de evaporar el disolvente bajo presión reducida, el residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano/ AcOEt como eluyente proporcionando el compuesto de interés.

Método E^{305,307}

En un tubo de microondas se introdujo el correspondiente estireno (1 mmol), el bromoarilo (1 mmol), piperidina (0.15 mL, 1.5 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (8.4 mg, 0.04 mmol) y DMF (4 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1.5 horas bajo irradiación con microondas a una temperatura de 140°C y una potencia de 70 W. La mezcla resultante se filtró sobre celite y el filtro se lavó a fondo con acetato de etilo. Seguidamente, el filtrado se lavó con una disolución de acuosa saturada de cloruro amónico (2 x 10 mL) y salmuera (2 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron los disolventes orgánicos bajo presión reducida. Después, el residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano/ AcOEt como eluyente proporcionando el compuesto de interés.

Método F³¹⁰

En un tubo de microondas se introdujo el correspondiente estireno (1 mmol), el bromoarilo (1 mmol), $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (1.1 mg, 0.005 mmol), K_2CO_3 (0.276 g, 2 mmol) y DMF (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos bajo irradiación con microondas a una temperatura de 175°C y una potencia de 25 W. La mezcla resultante se filtró sobre celite y el filtro se lavó a fondo con acetato de etilo. El

filtrado se lavó con agua (2 x 10 mL) y salmuera (2 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 . Después de evaporar el disolvente bajo atmósfera reducida, el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando Hexano/AcOEt como eluyente proporcionando el compuesto de interés.

3.5.3. Reacción de Wittig³⁰⁸

A una disolución de yoduro de metiltrifenilfosfonio (1.07 g, 2.64 mmol) en THF seco (3 mL) se le añadió, lentamente y bajo atmósfera de N_2 , una suspensión de *t*-BuOK (0.32 g, 2.86 mmol) en THF seco (2 mL). La agitación se mantuvo durante 1 hora. Luego se añadió el correspondiente aldehído (1 mmol) y se mantuvo la agitación hasta completar la reacción (4-5 h). La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (10 mL), se lavó con salmuera (2 x 10 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 . Después de evaporar el disolvente bajo atmósfera reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando una mezcla de Hexano/AcOEt como eluyente proporcionando el compuesto de interés.

Con esta reacción se obtuvieron el 2-vinilfenol (98%), el 3-vinilfenol (99%) y el 4-vinilfenol (95%).

3.5.4. Reacción de alilación³⁰⁶

A una disolución del derivado hidroxilado (1 mmol) en acetona (15 mL) se le añadió bromuro de alilo (0.260 mL, 3 mmol) y K_2CO_3 (0.415 g, 3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 24 horas bajo atmósfera de N_2 . A continuación la mezcla de reacción se filtró sobre gel de sílice y el filtro se lavó a fondo con acetato de etilo. Después de evaporar el disolvente hasta sequedad, se obtuvo un sólido que se purificó mediante recristalización con una mezcla de MeOH/agua proporcionando el compuesto de interés.

3.5.5. Reacción de amidación³¹²

A una disolución de ácido dodecanoico (0.200 g, 1 mmol) y trietilamina (0.15 mL, 1.05 mmol), en diclorometano seco (10 mL), se le añadió, bajo atmósfera de nitrógeno y a 0°C, una disolución de clorosulfonil isocianato (0.09 mL, 1 mmol) en diclorometano seco (5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a 0°C y después se añadió la correspondiente amina (2 mmol). La agitación se continuó durante 16 horas a temperatura ambiente. A continuación se añadió agua (20 mL) y

se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con bicarbonato sódico acuoso (2 x 20 mL) y agua (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y, después de evaporar el disolvente bajo atmósfera reducida, el residuo sólido obtenido se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando como eluyente Hexano/AcOEt proporcionando el compuesto de interés.

3.5.6. Síntesis de iminas

Método G³¹⁶

Una disolución del correspondiente hidroxibenzaldehído (1 mmol) y la correspondiente anilina (1 mmol) en etanol (3 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas.³¹⁹ El sólido formado en la reacción se filtró y se lavó con etanol frío. Finalmente se recristalizó con metanol o diclorometano proporcionando el compuesto de interés.

Método H³¹⁷

Una disolución del correspondiente hidroxibenzaldehído (1 mmol) y la correspondiente amina (1 mmol) en tolueno (5 mL), que contenía tamices moleculares de 3 Å (300 mg), se agitó bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 horas a temperatura ambiente.³²⁰ La mezcla de reacción se filtró sobre celite y el disolvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo obtenido se recristalizó con metanol o hexano proporcionando el compuesto de interés.

Método I³¹⁸

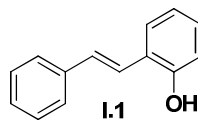
A una suspensión del correspondiente hidroxibenzaldehído (1 mmol) en agua (3 mL) se le añadió la correspondiente anilina (1 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas.³¹⁹ Luego, la mezcla de reacción se diluyó con agua (5 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre MgSO_4 . Después de evaporar el disolvente bajo atmósfera reducida, el residuo sólido obtenido fue purificado por recristalización con metanol proporcionando el compuesto de interés.

³¹⁹ En algunos casos fueron necesarios tiempos mayores de reacción.

³²⁰ En algunos casos se requirió someter la mezcla a reflujo (90°C), reduciéndose el tiempo de reacción.

3.5.7. Datos espectroscópicos

(E)-2-estirilfenol (I.1)

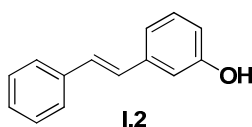


Obtenido bajo condiciones A (63%) y B (86%).

Sólido blanco, pf 138-140°C (pf lit. 143-144°C).³²¹

Datos espectrales consistentes con la literatura.³²²

(E)-3-estirilfenol (I.2)

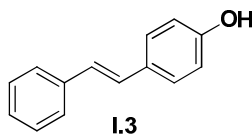


Obtenido bajo condiciones A (68%) y B (65%).

Sólido blanco, pf 117-119°C (pf lit.³²³ 124-124.5°C, pf lit.³²⁴ 128-129°C).

Datos espectrales consistentes con la literatura.³²⁴

(E)-4-estirilfenol (I.3)



Obtenido bajo condiciones A (26%) y B (97%).

Sólido blanco, bajo pf 182-184°C (pf lit. 186°C).³²⁵

Datos espectrales consistentes con la literatura.³²⁶

³²¹ Truce, W. E.; Lin, C. I. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4426-4428.

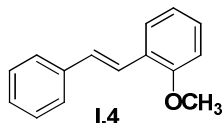
³²² Aslam, S. N.; Stevenson, P. C.; Phythian, S. J.; Veitch, N. C.; Hall, D. R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4214-4226.

³²³ Bruce, J. M.; Creed, D.; Dawes, K. *J. Chem. Soc. C* **1971**, 3749-3755.

³²⁴ Ali, H. A.; Kondo, K.; Tsuda, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1130-1136.

³²⁵ Gusten, H.; Salzwedel, M. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 173-185.

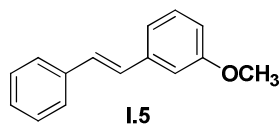
³²⁶ Sinha, A. K.; Kumar, V.; Sharma, A.; Sharma, R.; Kumar, R. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11070-11077.

(E)-1-metoxi-2-estirilbenceno (I.4)

Obtenido bajo condiciones A (81%) y B (65%).

Sólido blanco, pf 54-56°C (pf lit. 58.6-59.5°C).³²⁷

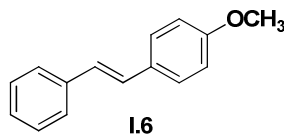
Datos espectrales consistentes con la literatura.³²⁸

(E)-1-metoxi-3-estirilbenceno (I.5)

Obtenido bajo condiciones B (21%).

Sólido blanco, pf 137-140°C (pf lit.³²⁹ 21-24°C, pf lit.³³⁰ 134-135°C).

Datos espectrales consistentes con la literatura.³³¹

(E)-1-metoxi-4-estirilbenceno (I.6)

Obtenido bajo condiciones A (88%) y B (78%).

Sólido blanco, pf 133-135°C (pf lit. 137.5-138°C).³³²

Datos espectrales consistentes con la literatura.³³³

³²⁷ Wood, C. S.; Mallory, F. B. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 3373-3377.

³²⁸ Arvela, R. K.; Leadbeater, N. E. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1786-1790.

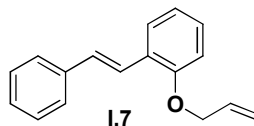
³²⁹ George, A. R.; Spickett, R. G. W. *J. Chem. Soc.* **1949**, 2724.

³³⁰ Ho, T.-I.; Chang, C.-M.; Wang, S. R.; Cheng, C. P. *J. Chem. Soc. Dalton* **1988**, 123-128.

³³¹ Roberts, J. C.; Pincock, J. A. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4279-4282.

³³² Linn, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3665-3671.

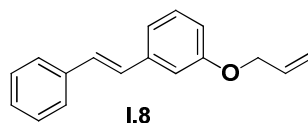
³³³ Djakovitch, L.; Heise, H.; Koehler, K. J. *Organomet. Chem.* **1999**, 584, 16-26.

(E)-1-(aliloxi)-2-estirilbenceno (I.7)

Obtenido mediante alilación del compuesto **I.1** (79%).

Sólido blanco, pf 40-42°C (pf lit. 46-48°C).³³⁴

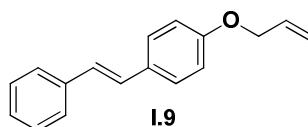
Datos espectrales consistentes con la literatura.³³⁴

(E)-1-(aliloxi)-3-estirilbenceno (I.8)

Obtenido mediante alilación del compuesto **I.2** (85%).

Sólido blanco.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.36 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 7.25 (2H, m), 7.11 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.08 (3H, m), 6.84 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.5 Hz), 6.09 (1H, m), 5.35 (2H, ddd, *J* = 64.2, 10.5, 1.3 Hz), 4.56 (2H, d, *J* = 5.3 Hz).

(E)-1-(aliloxi)-4-estirilbenceno (I.9)

Obtenido mediante alilación del compuesto **I.3** (90%).

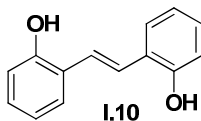
Sólido blanco, pf 120-121°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (2H, br d, *J* ≈ 7.4 Hz), 7.43 (2H, br d, *J* ≈ 8.8 Hz), 7.33 (2H, t, *J* ≈ 7.6 Hz), 7.22 (1H, tt, *J* ≈ 7.6, 1.5 Hz), 7.05 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 6.96 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 6.90 (2H, br d, *J* ≈ 8.8 Hz), 6.05 (1H, ddt, *J* = 7.5, 10.4, 5.5 Hz), 5.42 (1H, dq, *J* = 17.5, 1.5 Hz), 5.29 (1H, dd, *J* = 10.4, 1.5 Hz), 4.54 (2H, dt, *J* = 5.5, 1.5 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (C) 158.3, 137.6, 130.3 (CH), 133.2, 128.6 (x 2), 128.2, 127.7 (x 2), 127.2, 126.7, 126.3 (x 2), 115.0 (x 2) (CH₂), 117.7, 68.9.

HR EIMS *m/z* 236.1206 (M+H⁺) Calcd para C₁₇H₁₇O 236.1201.

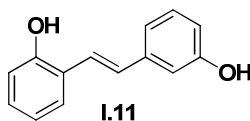
³³⁴ Black, M.; Cadogan, J. I. G.; McNab, H.; MacPherson, A. D.; Roddam, V. P.; Smith, C.; Swenson, H. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 2483-2493.

(E)-2-(2-hidroxiestiril)fenol (I.10)

Obtenido bajo condiciones C (61%).

Sólido blanco, pf 183-185°C (pf lit. 188-190°C).³³⁵

Datos espectrales consistentes con la literatura.³³⁵

(E)-2-(3-hidroxiestiril)fenol (I.11)

Obtenido bajo condiciones C (62%).

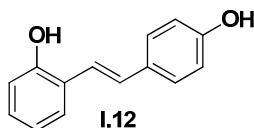
Sólido blanco, pf 118-120°C.

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7.52 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 7.42 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 7.14 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.10-7.05 (2H, m), 7.00-6.97 (2H, m), 6.84-6.80 (2H, m), 6.68 (1H, dt, *J* = 7.8, 1.5 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ (C) 158.6, 156.1, 141.0, 125.7 (CH) 130.5, 129.5, 129.3, 127.5, 124.8, 120.8, 119.2, 116.6, 115.3, 113.7.

IR ν_{max} cm⁻¹ 3420 (br, OH).

HR ESMS *m/z* 211.0761 (M-H⁻). Calcd. para C₁₄H₁₁O₂ 211.0759.

(E)-2-(4-hidroxiestiril)fenol (I.12)

Obtenido bajo condiciones C (67%).

Sólido blanco, pf 190-192°C (pf lit. 192-194°C).³²⁴

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.50 (2H, br s, OH), 7.52 (1H, d, *J* = 6.5 Hz), 7.37 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.19 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 7.08 (1H, d, *J* = 16.5 Hz), 7.04 (1H, dt, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 6.84 (1H, dd, *J* = 7.8, 1 Hz), 6.79 (1H, br t, *J* ≈ 7.5 Hz), 6.76 (2H, d, *J* = 8.5 Hz).

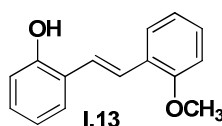
³³⁵ Bhatt, S.; Roy, K.; Nayak, S. K. *Synth. Commun.* **2010**, 2736-2746.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (C) 157.0, 154.6, 128.8, 124.3 (CH) 127.8, 127.7, 127.5 (x 2), 126.0, 120.4, 119.2, 115.7, 115.5 (x 2).

IR ν_{max} cm^{-1} 3400 (br, OH).

HR ESMS m/z 211.0754 (M-H $^-$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_2$ 211.0759.

(E)-2-(2-metoxiestiril)fenol (I.13)



Obtenido bajo condiciones C (56%).

Sólido blanco pf 104-106°C (pf lit. 105-106°C).³³⁶

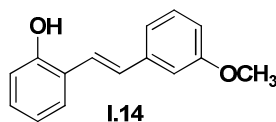
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.59 (1H, dd, J = 7.8, 1.5 Hz), 7.53 (1H, dd, J = 7.8, 1.5 Hz), 7.48 (2H, s), 7.15 (1H, dt, J = 7.6, 1.5 Hz), 7.06 (1H, dt, J = 7.6, 1.5 Hz), 6.90-6.80 (4H, br m), 5.00 (1H, br s, OH), 3.79 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 158.1, 155.8, 128.2, 126.4 (CH) 129.3, 129.2, 127.3, 127.0, 124.8, 123.9, 121.7, 120.8, 116.6, 112.0 (CH_3) 56.0.

IR ν_{max} cm^{-1} 3500 (br, OH).

HR ESMS m/z 225.0913 (M-H $^-$). Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_2$ 225.0916.

(E)-2-(3-metoxiestiril)fenol (I.14)



Obtenido bajo condiciones C (76%).

Sólido amarillento, pf 85-87°C (pf lit. 89-90°C).³³⁶

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.51 (1H, br d, J \approx 8 Hz), 7.47 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.20 (1H, t, J = 8.0 Hz), 7.11 (1H, t, J = 16.2 Hz), 7.10-7.05 (3H, br m), 6.85-6.80 (2H, m), 6.76 (1H, dd, J = 8.0, 1.5 Hz), 4.90 (1H, br s, OH), 3.77 (3H, s).

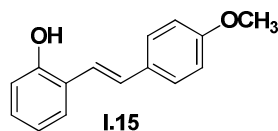
RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 161.3, 156.1, 141.0, 125.7 (CH) 130.5, 129.6, 129.2, 127.6, 125.1, 120.8, 120.1, 116.6, 114.0, 112.5 (CH_3) 55.6.

IR ν_{max} cm^{-1} 3400 (br, OH).

³³⁶ Lion, C. J.; Matthews, C. S.; Stevens, M. F. G.; Westwell, A. D. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1292-1295.

HR ESMS m/z 227.1073 ($M+H^+$). Calcd. para $C_{15}H_{15}O_2$ 227.1072.

(E)-2-(4-metoxiestiril)fenol (I.15)

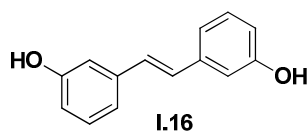


Obtenido bajo condiciones C (52%).

Sólido blanco, pf 134-135°C (pf lit.³³⁶ 117-118°C, pf lit.³³⁷ 153°C).

Datos espectrales consistentes con la literatura.^{336,337}

(E)-3-(3-hidroxiestiril)fenol (I.16)



Obtenido bajo condiciones C (81%).

Sólido blanco, pf 149-151°C (pf lit. 152-153°C).³²⁴

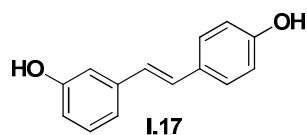
RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.15 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.01 (2H, s), 7.00-6.95 (4H, br m), 6.69 (2H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 158.7 (x 2), 140.2 (x 2) (CH) 130.6 (x 2), 129.6 (x 2), 119.3 (x 2), 115.7 (x 2), 113.8 (x 2).

IR ν_{max} cm^{-1} 3350 (OH).

HR ESMS m/z 211.0756 ($M-H^-$). Calcd. para $C_{14}H_{11}O_2$ 211.0759.

(E)-3-(4-hidroxiestiril)fenol (I.17)



Obtenido bajo condiciones C (88%).

Sólido blanco, pf 211-213°C (pf lit. 216-218°C).³²⁴

³³⁷ Chantal, M.; Vervandier-Fasseur, D.; Meunier, P.; Cattey, H.; Hierso, J.-C. *Tetrahedron* **2012**, 68, 3899-3907.

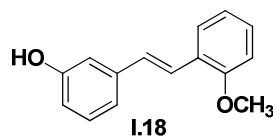
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.35 (2H, br d, $J \approx 8$ Hz), 7.12 (1H, br t, $J \approx 8$ Hz), 7.00 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 6.96 (1H, br d, $J \approx 8$ Hz), 6.95 (1H, br s), 6.87 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 6.78 (2H, br d, $J \approx 8$ Hz), 6.66 (1H, br d, $J \approx 8$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 158.6, 158.3, 140.7, 130.4 (CH) 130.5, 129.5, 128.8 (x 2), 126.8, 119.0, 116.5 (x 2), 115.1, 113.5.

IR ν_{max} cm^{-1} 3350 (br, OH).

HR ESMS m/z 211.0756 (M-H^-). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_2$ 211.0759.

(*E*)-3-(2-metoxiestiril)fenol (I.18)



Obtenido bajo condiciones C (85%).

Sólido blanco, pf 72-73°C (pf lit. 78-79°C).³³⁶

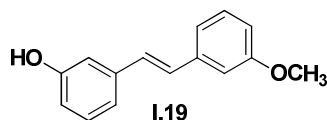
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.52 (1H, dd, $J = 7.4, 1.5$ Hz), 7.42 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.16 (1H, dt, $J = 8.0, 1.5$ Hz), 7.13 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.02 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.00-6.95 (2H, m), 6.90-6.85 (2H, m), 6.70 (1H, dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz), 4.80 (1H, br s, OH), 3.77 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 158.5, 158.2, 140.8, 124.4 (CH) 130.6, 129.8, 129.7, 127.3, 127.2, 121.7, 119.3, 115.5, 113.7, 112.1 (CH_3) 56.0.

IR ν_{max} cm^{-1} 3400 (br, OH).

HR ESMS m/z 225.0920 (M-H^-). Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_2$ 225.0916.

(*E*)-3-(3-metoxiestiril)fenol (I.19)



Obtenido bajo condiciones C (71%).

Sólido blanco, pf 78-80°C (pf lit. 74-75°C).³³⁶

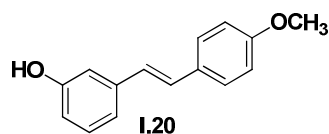
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.19 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.14 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.05-6.95 (6H, br m), 6.76 (1H, dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz), 6.72 (1H, dd, $J = 7.8, 2.0$ Hz), 3.75 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 161.3, 158.6, 140.1 (x 2) (CH) 130.6, 130.5, 129.9, 129.5, 120.1, 119.4, 115.7, 114.2, 113.9, 112.7 (CH_3) 55.6.

IR ν_{\max} cm^{-1} 3400 (OH).

HR ESMS m/z 225.0919 (M-H^+). Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_2$ 225.0916.

(E)-3-(4-metoxiestiril)fenol (I.20)

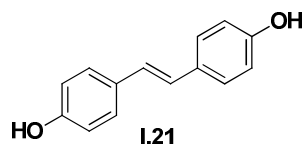


Obtenido bajo condiciones C (72%).

Sólido blanco, pf 162-164°C (pf lit.³³⁶ 159-160°C, pf lit.³³⁷ 151°C).

Datos espectrales consistentes con la literatura.^{336,337}

(E)-4-(4-hidroxiestiril)fenol (I.21)

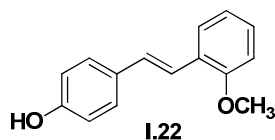


Obtenido bajo condiciones C (64%).

Sólido amarillento, pf 263-265°C (pf lit. 279-281°C).³²⁶

Datos espectrales consistentes con la literatura.³²⁶

(E)-4-(2-metoxiestiril)fenol (I.22)

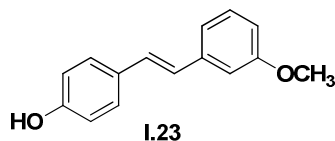


Obtenido bajo condiciones C (53%).

Sólido amarillento, pf 119-121°C (pf lit. 145-146°C).³³⁶

Datos espectrales consistentes con la literatura.^{336,338}

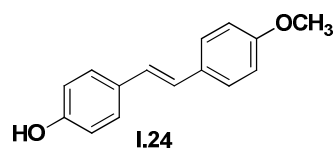
³³⁸ Song, T.; Zhou, B.; Peng, G.-W.; Zhang, Q.-B.; Wu, L.-Z.; Liu, Q.; Yong, W. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 678-682.

(E)-4-(3-metoxiestiril)fenol (I.23)

Obtenido bajo condiciones C (62%).

Sólido blanco pf 125-127°C (pf lit.³³⁶ 118-119°C, pf lit.³²⁶ 132-134°C).

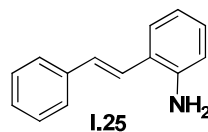
Datos espectrales consistentes con la literatura.^{326,336}

(E)-4-(4-metoxiestiril)fenol (I.24)

Obtenido bajo condiciones C (50%).

Sólido amarillento, pf 198-200°C (pf lit. 211-212°C).³³⁷

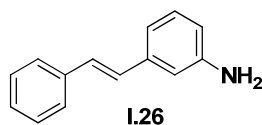
Datos espectrales consistentes con la literatura.³³⁷

(E)-2-estirilanilina (I.25)

Obtenido bajo condiciones E (75%).

Sólido amarillento pf 102-104°C.

Datos espectrales consistentes con la literatura.³³⁹

(E)-3-estirilanilina (I.26)

Obtenido bajo condiciones E (69%).

Sólido amarillento, pf 109-111°C.

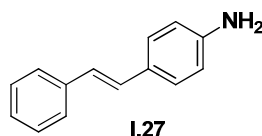
³³⁹ Shen, M.; Leslie, B. E.; Driver, T. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5056-5059.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.42 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.33 (1H, dt, $J = 7.6, 1.0$ Hz), 7.20 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.10 (2H, AB sistema, $J = 16.2$ Hz), 7.00 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 6.88 (1H, br s), 6.65 (1H, dt, $J = 7.8, 1.0$ Hz), 3.70 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 146.6, 138.3, 137.3 (CH) 129.5, 128.8, 128.6 (x 2), 128.4, 127.5, 126.4 (x 2), 117.2, 114.6, 112.8.

Datos de RMN ^1H consistentes con los reportados en la literatura.³⁴⁰

(E)-4-estirilnilina (I.27)

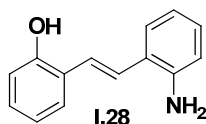


Obtenido bajo condiciones E (68%).

Sólido amarillento pf 147-149°C.

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁴¹

(E)-2-(2-aminoestiril)fenol (I.28)



Obtenido bajo condiciones C (64%).

Sólido blanco, pf 155-157°C.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.59 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 7.43 (1H, dd, $J = 7.8, 1.0$ Hz), 7.30 (2H, AB sistema, $J = 16.0$ Hz), 7.06 (1H, dt, $J = 8.2, 1.7$ Hz), 7.01 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 6.85-6.80 (2H, m), 6.75-6.70 (2H, m), 4.80 (3H, br s, OH, NH_2).

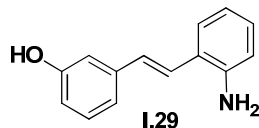
RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 156.0, 145.9, 126.4, 125.8 (CH) 129.2, 129.1, 127.6, 127.3, 125.3, 124.8, 120.8, 119.8, 117.7, 116.6.

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3200 (br, OH), 3400, 3320 (NH_2).

HR ESMS m/z 212.1078 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

³⁴⁰ Motoshima, K.; Noguchi-Yachide, T.; Sugita, K.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5001-5014.

³⁴¹ Arvelaa, R. K.; Leadbeater, N. E.; Sangi, M. S.; Williams, V. A.; Granados, P.; Singer, R. D. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 161-168.

(E)-3-(2-aminoestiril)fenol (I.29)

Obtenido bajo condiciones C (62%).

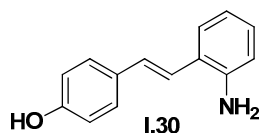
Sólido amarillento, pf 68-70°C.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.40 (1H, dd, $J = 7.8, 1.0$ Hz), 7.26 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 7.14 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.05-7.00 (3H, m), 6.91 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 6.75-6.68 (3H, br m).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 158.6, 146.1, 140.7, 127.3 (CH) 130.6, 130.1, 129.5, 125.2, 124.9, 119.8, 119.3, 117.8, 115.4, 113.9.

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3200 (br, OH, NH_2).

HR ESMS m/z 212.1073 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

(E)-4-(2-aminoestiril)fenol (I.30)

Obtenido bajo condiciones E (51%).

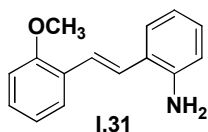
Sólido amarillento, pf 193-195°C.

RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.40 (1H, br s, OH), 7.44 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.36 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 7.15 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.92 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.75 (2H, dt, $J = 8.5$ Hz), 6.63 (1H, dd, $J = 7.8, 1.0$ Hz), 6.53 (1H, br t, $J \approx 8$ Hz), 5.20 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (C) 156.8, 145.9, 129.0, 121.5 (CH) 127.8, 127.7 (x 2), 127.0, 125.1, 121.2, 116.3, 115.4, 115.3 (x 2).

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3200 (br, OH, NH_2).

HR ESMS m/z 212.1073 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

(E)-2-(2-metoxiestiril)anilina (I.31)

Obtenido bajo condiciones F (72%).

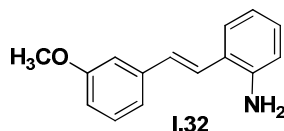
Sólido amarillento, pf 101-103°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 7.42 (1H, dd, $J = 7.8, 1.0$ Hz), 7.33 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.23 (1H, dt, $J = 7.8, 1.6$ Hz), 7.16 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.08 (1H, dt, $J = 7.6, 1.5$ Hz), 6.96 (1H, br t, $J = 7.6$ Hz), 6.89 (1H, br d, $J = 7.8$ Hz), 6.80 (1H, br t, $J = 7.6$ Hz), 6.70 (1H, dd, $J = 7.8, 1.0$ Hz), 3.90 (2H, br s, NH_2), 3.87 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 156.9, 143.8, 126.8, 124.6 (CH) 128.6, 128.4, 127.3, 126.6, 125.3, 124.7, 120.7, 119.1, 116.2, 110.9 (CH_3) 55.5.

IR ν_{max} cm^{-1} 3385, 3360 (NH_2).

HR ESMS m/z 226.1231 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}$ 226.1232.

(E)-2-(3-metoxiestiril)anilina (I.32)

Obtenido bajo condiciones F (69%).

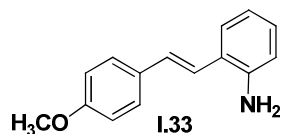
Aceite amarillento.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (1H, br d, $J = 8.0$ Hz), 7.34 (1H, t, $J = 8.0$ Hz), 7.22 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.20-7.15 (2H, m), 7.12 (1H, br s), 7.03 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.90-6.85 (2H, br m), 6.75 (1H, br d, $J \approx 8.0$ Hz), 3.88 (3H, s), 3.75 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 159.8, 144.0, 139.0, 123.5 (CH) 129.8, 129.5, 128.6, 127.1, 124.4, 119.0, 118.9, 116.1, 113.0, 111.6 (CH_3) 55.1.

IR ν_{max} cm^{-1} 3440, 3370 (NH_2).

HR ESMS m/z 226.1229 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}$ 226.1232.

(E)-2-(4-metoxiestiril)anilina (I.33)

Obtenido bajo condiciones F (59%).

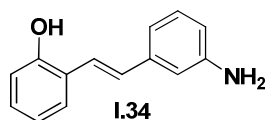
Sólido amarillento, pf 120-122°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.49 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.43 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.13 (1H, dt, $J = 7.8, 1.0$ Hz), 7.06 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.99 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.94 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.85 (1H, br t, $J = 7.6$ Hz), 6.74 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 3.86 (3H, s), 3.70 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 159.2, 143.2, 130.3, 124.4 (CH) 129.9, 128.2, 127.6 (x 2), 126.9, 122.0, 119.4, 116.4, 114.1 (x 2) (CH_3) 55.2.

IR ν_{max} cm^{-1} 3340, 3360 (NH_2).

HR ESMS m/z 226.1236 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}$ 226.1232.

(E)-2-(3-aminoestiril)fenol (I.34)

Obtenido bajo condiciones C (70%).

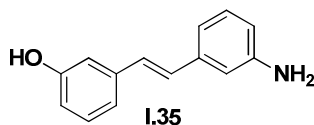
Sólido blanco, pf 159-161°C.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.51 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.41 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.10-7.00 (3H, m), 6.93 (1H, br s), 6.88 (1H, br d, $J \approx 7.8$ Hz), 6.80 (2H, m), 6.62 (1H, dt, $J = 7.8, 1.0$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 156.1, 148.7, 140.4, 125.9 (CH) 130.2, 129.7, 129.3, 127.4, 124.3, 120.8, 118.1, 116.6, 115.9, 114.3.

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3200 (br, OH), 3350, 3290 (NH_2).

HR ESMS m/z 212.1074 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

(E)-3-(3-aminoestiril)fenol (I.35)

Obtenido bajo condiciones D (74%).

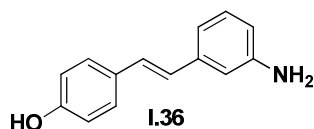
Sólido blanco, pf 165-167°C.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.15 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.08 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.00-6.90 (5H, s), 6.87 (1H, br d, $J = 7.8$ Hz), 6.68 (1H, dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz), 6.63 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 158.6, 148.7, 140.2, 139.5 (CH) 130.5, 130.3, 130.0, 129.2, 119.2, 118.0, 116.2, 115.6, 114.3, 113.8.

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3200 (br, OH), 3300, 3180 (NH_2).

HR ESMS m/z 212.1075 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

(E)-4-(3-aminoestiril)fenol (I.36)

Obtenido bajo condiciones C (75%).

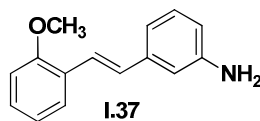
Sólido amarillento pf 241-243°C.

RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.40 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.01 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.86 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.78 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.74 (1H, t, $J = 1.5$ Hz), 6.71 (1H, br d, $J \approx 7.5$ Hz), 6.47 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 5.00 (3H, br s, OH, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (C) 157.1, 148.7, 137.9, 128.2 (CH) 129.0, 127.7 (x 2), 127.3, 126.0, 115.5 (x 2), 114.3, 113.2, 111.3.

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3200 (br, OH, NH_2).

HR ESMS m/z 212.1076 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

(E)-3-(2-metoxiestiril)anilina (I.37)

Obtenido bajo condiciones F (71%).

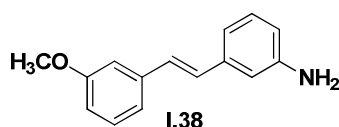
Aceite amarillento.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.59 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 7.25 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 7.15 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.03 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 7.00-6.90 (4H, br m), 6.60 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 3.88 (3H, s), 3.64 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 156.9, 146.6, 139.1, 126.5 (CH) 129.5, 129.2, 128.6, 126.4, 123.3, 120.7, 117.5, 114.5, 113.0, 111.0 (CH_3) 55.6.

IR ν_{max} cm^{-1} 3450, 3370 (NH_2).

HR ESMS m/z 226.1227 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}$ 226.1232.

(E)-3-(3-metoxiestiril)anilina (I.38)

Obtenido bajo condiciones F (73%).

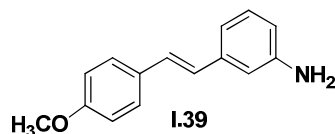
Sólido blanco, pf 75-77°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.31 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.20 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.15 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.08 (3H, m), 6.97 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.87 (2H, m), 6.64 (1H, br d, $J \approx 8.0$ Hz), 3.88 (3H, s), 3.70 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 159.8, 146.6, 138.8, 138.1 (CH) 129.5, 129.4, 129.1, 128.3, 119.1, 117.2, 114.6, 113.1, 112.8, 111.7 (CH_3) 55.1.

IR ν_{max} cm^{-1} 3450, 3370 (NH_2).

HR ESMS m/z 226.1233 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}$ 226.1232.

(E)-3-(4-metoxiestiril)anilina (I.39)

Obtenido bajo condiciones F (71%).

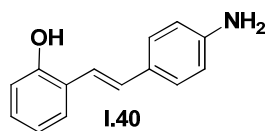
Sólido blanco, pf 143-145°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.16 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 6.95-6.90 (4H, m), 6.84 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 6.60 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 3.85 (3H, s), 3.70 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 159.2, 146.6, 138.7, 130.2 (CH) 129.5, 125.0, 127.6 (x 2), 123.8, 117.0, 114.3, 114.1 (x 2), 112.7 (CH_3) 55.2.

IR ν_{max} cm^{-1} 3400, 3330 (NH_2).

HR ESMS m/z 226.1230 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}$ 226.1232.

(E)-2-(4-aminoestiril)fenol (I.40)

Obtenido bajo condiciones E (39%).

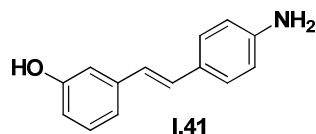
Sólido amarillento, pf 179-181°C.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.48 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.30 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.24 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.05-7.00 (2H, m), 6.82-6.79 (2H, m), 6.70 (2H, d, $J = 7.8$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 155.6, 148.3, 129.8, 126.5 (CH) 129.6, 128.6, 128.4 (x 2), 127.0, 120.8, 120.7, 116.6 (x 3).

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3100 (br, OH, NH_2).

HR ESMS m/z 212.1073 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

(E)-3-(4-aminoestiril)fenol (I.41)

Obtenido bajo condiciones D (68%).

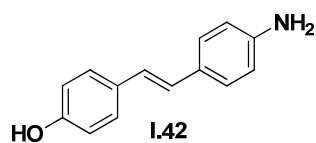
Sólido amarillento pf 146-148°C.

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.30 (1H, br s, OH), 7.26 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.11 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 6.95 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.92 (1H, br d, $J \approx 8.0$ Hz), 6.88 (1H, t, $J = 2.0$ Hz), 6.80 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.60 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 6.56 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 5.30 (2H, br s, NH_2).

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (C) 157.5, 148.7, 139.3, 124.7 (CH) 129.4, 128.8, 127.6 (x 2), 123.0, 116.8, 113.9 (x 2), 113.7, 112.3.

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3200 (br, OH, NH_2).

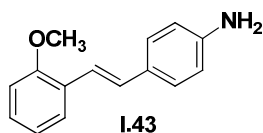
HR ESMS m/z 212.1079 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

(E)-4-(4-aminoestiril)fenol (I.42)

Obtenido bajo condiciones E (52%).

Sólido amarillento pf 82-84°C.

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁴²

(E)-4-(2-metoxiestiril)anilina (I.43)

Obtenido bajo condiciones F (74%).

Sólido amarillento, pf 70-72°C (pf lit. 68-70°C).³⁴³

³⁴² Kim, J. Y.; Lee, W. L.; Kim, Y. S.; Lee, Y.; Ryu, Y. B.; Kim, S.; Ryu, H. W.; Curtis-Long, M. J.; Lee, K. W.; Woo, S.; Park, K. H. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2125-2131

³⁴³ Ullrich, H.; Rao, D. V.; Stuber, F. A.; Sayigh, A. A. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1121-1125.

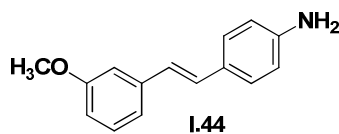
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (1H, dd, $J = 7.8, 1.0$ Hz), 7.37 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.30 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 7.21 (1H, br t, $J \approx 7.8$ Hz), 7.03 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 6.96 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 6.89 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.71 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 3.88 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 156.7, 145.9, 130.0, 128.8 (CH) 129.1, 127.9, 127.8 (x 2), 126.0, 120.7, 119.9, 115.2 (x 2), 110.9 (CH_3) 55.5.

IR ν_{max} cm^{-1} 3460, 3370 (NH_2).

HR ESMS m/z ($\text{M}+\text{H}^+$) 226.1230. Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}$ 226.1232.

(E)-4-(3-metoxiestiril)anilina (I.44)

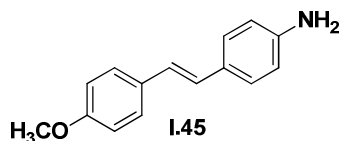


Obtenido bajo condiciones F (45%).

Sólido amarillento, pf 76-78°C (pf lit. 70-71°C).³⁴⁴

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁴⁴

(E)-4-(4-metoxiestiril)anilina (I.45)



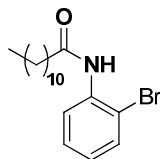
Obtenido bajo condiciones F (55%).

Sólido amarillento, pf 157-159°C.

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁴⁵

³⁴⁴ Sun, B.; Hoshino, J.; Jermihov, K.; Marler, L.; Pezzuto, J. M.; Mesecar, A. D.; Cushman, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5352-5366.

³⁴⁵ Kormos, C. M.; Leadbeater, N. E. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3854-3858.

N-(2-bromofenil)dodecanamida

Obtenido por amidación de 2-bromoanilina (60%).

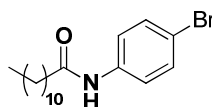
Sólido blanco pf 73-75°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (1H, br d, $J \approx 7.8$ Hz), 7.60 (1H, br s, NH), 7.51 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz), 7.28 (1H, dt, $J = 7.5, 1.0$ Hz), 6.95 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 2.41 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.74 (2H, quint, $J = 7.5$ Hz), 1.40-1.20 (16H, br m), 0.89 (3H, t, $J = 7.0$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 171.3, 122.0, 113.3 (CH) 135.8, 132.1, 128.3, 125.0 (CH_2) 38.0, 31.9, 29.6 (x 2), 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 25.5, 22.7 (CH_3) 14.1.

IR ν_{max} cm^{-1} 3280 (NH), 1664 (C=O).

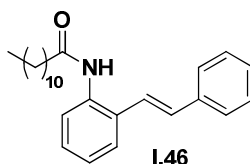
HR ESMS m/z 354.1432 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NOBr}$ 354.1432.

N-(4-bromofenil)dodecanamida

Obtenido por amidación de 4-bromoanilina (62%).

Sólido amarillento, pf 106-108°C (pf lit. 106°C).³⁴⁶

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁴⁷

(E)-N-(2-estirilfenil)dodecanamida (I.46)

Obtenido por acoplamiento de Heck (condiciones E) de estireno con N-(2-bromofenil)dodecanamida (55%).

Sólido amarillento, pf 100-102°C.

³⁴⁶ Houston, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 1303-1304.

³⁴⁷ Chen, Y.; Zhu, B.; Zhang, F.; Han, Y.; Bo, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6015-6018.

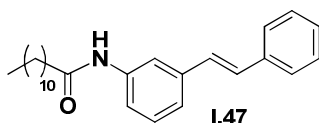
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (1H, br d, $J \approx 7.5$ Hz), 7.51 (1H, br d, $J \approx 8.0$ Hz), 7.49 (2H, br d, $J \approx 7.5$ Hz), 7.37 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.30-7.20 (4H, br m), 6.98 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 2.40 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.75 (2H, m), 1.40-1.20 (16H, br m), 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 171.6, 137.0, 132.4, 130.3 (CH) 134.9, 128.8 (x 4), 128.3, 128.1, 126.6, 125.4, 124.2, 123.5 (CH_2) 37.6, 31.9, 29.7, 29.6 (x 2), 29.5, 29.4, 29.3, 25.9, 22.7 (CH_3) 14.1.

IR ν_{max} cm^{-1} 3285 (NH), 1664 (C=O).

HR ESMS m/z 377.2796 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{NO}$ 378.2797.

(E)-N-(3-estirilfenil)dodecanamida (I.47)



Obtenido por amidación del compuesto **I.26** (64%).

Sólido amarillento, pf 103-105°C.

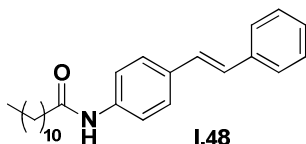
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (1H, br s, NH), 7.48 (2H, br d, $J = 7.47$ Hz), 7.35-7.20 (7H, br m), 7.08 (2H, AB sistema, $J = 16.2$ Hz), 2.36 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.74 (2H, quint, $J = 7.5$ Hz), 1.40-1.20 (16H, br m), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 171.6, 138.4, 138.3, 137.1 (CH) 129.3, 128.7 (x 2), 128.3, 127.7, 126.5 (x 2), 122.5, 118.9, 117.7, 117.6 (CH_2) 37.9, 31.9, 29.6 (x 2), 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 25.6, 22.7 (CH_3) 14.1.

IR ν_{max} cm^{-1} 3400 (NH), 1660 (C=O).

HR ESMS m/z 377.2794 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{NO}$ 378.2797.

(E)-N-(4-estirilfenil)dodecanamida (I.48)



Obtenido por acoplamiento de Heck (condiciones E) de estireno con *N*-(4-bromofenil)dodecanamida (58%).

Sólido amarillento, pf 168-170°C.

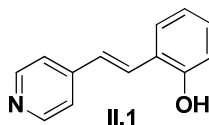
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.50-7.45 (6H, br m), 7.35 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.25 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.14 (1H, br s, NH), 7.05 (2H, sistema AB, $J = 16.2$ Hz), 2.36 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.73 (2H, quint, $J = 7.5$ Hz), 1.40-1.20 (16H, br m), 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 171.3, 137.4 (x 2), 128.8 (CH) 128.6 (x 2), 128.0, 127.8, 127.4, 127.1 (x 2), 126.4 (x 2), 119.8 (x 2) (CH_2) 37.9, 31.9, 29.6 (x 2), 29.5, 29.4, 29.3 (x 2), 25.6, 22.7 (CH_3) 14.1.

IR ν_{max} cm^{-1} 3300 (NH), 1659 (C=O).

HR ESMS m/z 377.2798 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{NO}$ 378.2797.

(E)-2-[2-(piridin-4-il)vinil]fenol (II.1)



Obtenido bajo condiciones E (45%).

Sólido amarillo, pf 173-175°C (pf lit. 192-194°C).³⁴⁸

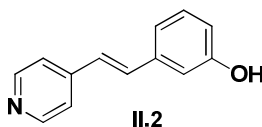
RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.52 (2H, d, $J = 5.0$ Hz), 7.66 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 7.60 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.50 (2H, d, $J = 5.0$ Hz), 7.21 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 7.16 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 6.90 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.85 (1H, t, $J = 7.8$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (C) 155.6, 144.9, 122.8 (CH) 150.0 (x 2), 129.7, 128.4, 127.3, 125.4, 120.6 (x 2), 119.3, 116.0.

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3200 (br, OH).

HR ESMS m/z 198.0915 ($\text{M}+\text{H}^+$) Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{NO}$ 198.0919.

(E)-3-[2-(piridin-4-il)vinil]fenol (II.2)



Obtenido bajo condiciones E (47%).

Sólido blanco, pf 210-212°C.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 8.46 (2H, d, $J = 5.8$ Hz), 7.55 (2H, d, $J = 5.8$ Hz), 7.40 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.20 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.10-7.05 (2H, m), 7.04 (1H, br s), 6.77 (1H, dd, $J = 7.8, 2.5$ Hz).

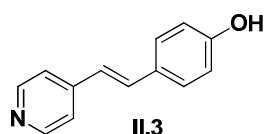
³⁴⁸ Papa, D.; Schwenk, E.; Klingsberg, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 253-255.

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 159.0, 147.6, 139.0 (CH) 150.4 (x 2), 135.5, 130.8, 126.4, 122.5 (x 2), 120.0, 117.1, 114.6.

IR ν_{max} cm^{-1} 3500-3200 (br, OH).

HR ESMS m/z 198.0919 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{NO}$ 198.0919.

(E)-4-[2-(piridin-4-il)vinil]fenol (II.3)

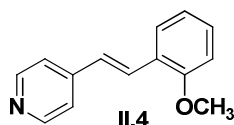


Obtenido bajo condiciones E (40%).

Sólido amarillo, pf 265-268°C (pf lit. 280-282°C).³⁴⁸

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁴⁹

(E)-4-(2-metoxiestiril)piridina (II.4)

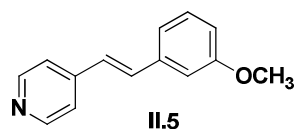


Obtenido bajo condiciones D (80%).

Aceite incoloro.

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁰

(E)-4-(3-metoxiestiril)piridina (II.5)



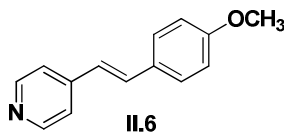
Obtenido bajo condiciones D (79%).

Aceite incoloro.

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁰

³⁴⁹ Koopmans, C.; Ritter, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3502-3503

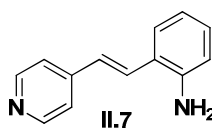
³⁵⁰ Shi, C.; Ding, J.; Jiang, J.; Chen, J.; Wu, H.; Liu, M. *J. Chem. Res.* **2012**, *36*, 322-325.

(E)-4-(4-metoxiestiril)piridina (II.6)

Obtenido bajo condiciones D (78%).

Sólido amarillento, pf 138-140°C (pf lit. 122-125°C).³⁵⁰

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁰

(E)-2-[2-(piridin-4-il)vinil]anilina (II.7)

Obtenido bajo condiciones E (71%).

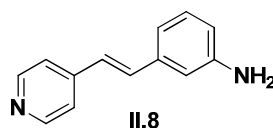
Sólido amarillento pf 180-182°C.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.50 (2H, br d, *J* = 5.8 Hz), 7.70 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 7.58 (2H, br d, *J* ≈ 5.8 Hz), 7.48 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.01 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 6.97 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 6.67 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.57 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 5.50 (2H, br s, NH₂).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (C) 147.1, 145.3, 119.9 (CH) 149.9 (x 2), 129.7, 129.2, 126.1, 124.1, 121.0 (x 2), 116.6, 116.1.

IR ν_{max} cm⁻¹ 3420, 3320, 3200 (br, NH₂).

HR ESMS *m/z* 197.1076 (M+H⁺). Calcd. para C₁₃H₁₃N₂ 197.1079.

(E)-3-[2-(piridin-4-il)vinil]anilina (II.8)

Obtenido bajo condiciones E (72%).

Sólido amarillento, pf 174-176°C (pf lit. 191-192°C).³⁵¹

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.52 (2H, br d, *J* ≈ 5.8 Hz), 7.52 (2H, br d, *J* ≈ 5.8 Hz), 7.37 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 7.05-7.00 (2H, m), 6.85-6.80 (2H, m), 6.57 (1H, br d, *J* ≈ 8.0 Hz), 5.10 (2H, br s, NH₂).

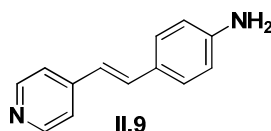
³⁵¹ Baker, B. R.; Gibson, R. E. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 315-322.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (C) 149.0, 144.5, 136.7 (CH) 150.0 (x 2), 134.1, 129.4, 125.0, 120.9 (x 2), 115.3, 114.8, 112.3.

IR ν_{max} cm^{-1} 3400-3200 (NH_2).

HR ESMS m/z 197.1079 ($\text{M}+\text{H}^+$) Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2$ 197.1079.

(E)-4-[2-(piridin-4-il)vinil]anilina (II.9)



Obtenido bajo condiciones E (61%).

Sólido amarillo, pf 270-272°C (pf lit.³⁵¹ 279-281°C, pf lit.³⁵² 270-274°C).

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.45 (2H, br d, $J \approx 5.8$ Hz), 7.43 (2H, br d, $J \approx 5.8$ Hz), 7.35-7.30 (3H, m), 6.86 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 6.58 (2H, br d, $J = 8.3$ Hz), 5.50 (2H, br s, NH_2).

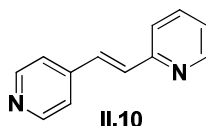
RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (C) 145.2, 123.6, * (CH) 149.8 (x 2), 133.7, 128.4 (x 2), 120.2 (x 2), 119.8, 113.8 (x 2).

IR ν_{max} cm^{-1} 3400-3200 (NH_2).

HR ESMS m/z 197.1076 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2$ 197.1079.

* Señal cuaternaria solapada con otra señal y no ha podido ser asignada

(E)-1-(2-piridil)-2-(4-piridil)etileno (II.10)



Obtenido bajo condiciones E (54%).

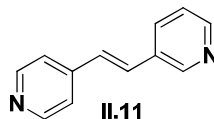
Sólido amarillo, pf 70-72°C (pf lit. 75-76°C).³⁵³

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁴

³⁵² Lord, S. J.; Lee, H. D.; Samuel, R.; Weber, R.; Liu, N.; Conley, N. R.; Thompson, M. A.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 14157-14167.

³⁵³ Miyano, S.; Abe, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1967**, *15*, 511-513.

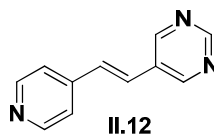
³⁵⁴ Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; Geahlen, R. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 211-214.

(E)-1-(3-piridil)-2-(4-piridil)etileno (II.11)

Obtenido bajo condiciones E (64%).

Sólido amarillo, pf 64-65 °C (pf lit. 64-66°C).³⁵⁵

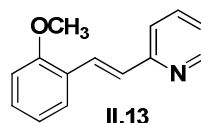
Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁵

(E)-1-(2-pirimidin)-2-(4-piridil)etileno (II.12)

Obtenido bajo condiciones E (52%).

Sólido amarillo, pf 123-125°C (pf lit. 121°C).³⁵⁶

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁶

(E)-2-(2-metoxiestiril)piridina (II.13)

Obtenido bajo condiciones D (65%).

Aceite incoloro.

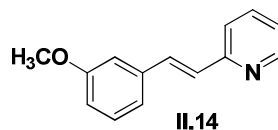
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8.59 (1H, br d, *J* ≈ 4.5 Hz), 7.93 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 7.62 (2H, m), 7.42 (1H, br d, *J* ≈ 7.5 Hz), 7.26 (1H, señal parcialmente solapada), 7.23 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 7.10 (1H, dd, *J* = 8.0, 4.5 Hz), 6.96 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 6.90 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 3.87 (3H, s).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (C) 157.5, 156.4, 125.6 (CH) 149.5, 136.3, 129.3, 128.7, 127.8, 127.3, 121.7, 121.6, 120.7, 110.9 (CH₃) 55.4.

HR ESMS *m/z* 212.1075 (M+H⁺). Calcd. para C₁₄H₁₄NO 212.1075.

³⁵⁵ Cong, X.; Tang, H.; Wu, C.; Zeng, X. *Organometallics* **2013**, 32, 6565-6575.

³⁵⁶ Felbecker, H.; Hollenberg, D.; Schaaf, R.; Bluhm, T.; Perkampus, H. H. *J. Heterocycl. Chem.* **1978**, 15, 749-752.

(E)-2-(3-metoxiestiril)piridina (II.14)

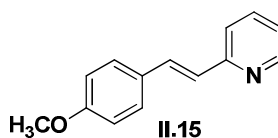
Obtenido bajo condiciones D (67%).

Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.60 (1H, br d, $J \approx 4.5$ Hz), 7.63 (1H, dt, $J = 7.8, 2.0$ Hz), 7.60 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 7.40 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.29 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.20-7.10 (4H, br m), 6.86 (1H, dd, $J = 8.3, 2.5$ Hz), 3.82 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 159.8, 155.5, 138.1 (CH) 149.6, 136.4, 132.6, 129.6, 128.2, 122.0, 121.9, 119.8, 114.2, 112.1 (CH_3) 55.2.

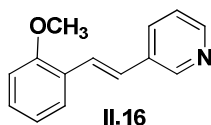
HR ESMS m/z 212.1077 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

(E)-2-(4-metoxiestiril)piridina (II.15)

Obtenido bajo condiciones D (61%).

Sólido blanco, pf 73-75°C (pf lit. 74-76°C).³⁵⁷

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁷

(E)-3-(2-metoxiestiril)piridina (II.16)

Obtenido bajo condiciones D (78%).

Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.72 (1H, br s), 8.46 (1H, dd, $J = 5.0, 1.5$ Hz), 7.84 (1H, br d, $J \approx 8.5$ Hz), 7.58 (1H, br d, $J = 7.5$ Hz), 7.52 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 7.30-7.25 (2H, m), 7.08 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 6.98 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 6.91 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 3.79 (3H, s).

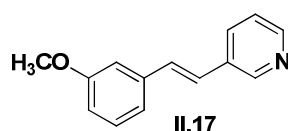
³⁵⁷ Annapurna, M.; Reddy, P. V.; Singh, S. P.; Kantam, M. L. *Tetrahedron* **2013**, 69, 10940-10945.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 157.1, 133.6, * (CH) 148.6, 148.3, 132.6, 129.3, 126.7, 125.8, 125.3, 123.4, 120.8, 111.0 (CH_3) 55.4.

HR ESMS m/z 212.1077 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

* Señal cuaternaria solapada con otra señal y no ha podido ser asignada.

(E)-3-(3-metoxiestiril)piridina (II.17)



Obtenido bajo condiciones D (79%).

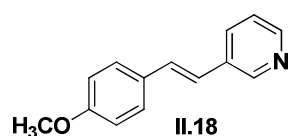
Aceite incoloro.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.70 (1H, br s), 8.48 (1H, dd, $J = 5.0, 1.5$ Hz), 7.78 (1H, dt, $J = 8.3, 1.5$ Hz), 7.30-7.25 (2H, m), 7.15-7.00 (4H, br m), 6.84 (1H, dd, $J = 8.0, 2.5$ Hz), 3.83 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 159.9, 138.0, 132.8 (CH) 148.5, 148.4, 132.5, 130.6, 129.6, 125.1, 123.4, 119.3, 113.8, 111.8 (CH_3) 55.2.

HR ESMS m/z 212.1074 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}$ 212.1075.

(E)-3-(4-metoxiestiril)piridina (II.18)

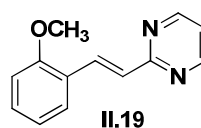


Obtenido bajo condiciones D (82%).

Sólido blanco pf 105-107°C (pf lit. 96-98°C).³⁵⁷

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁷

(E)-2-(2-metoxiestiril)pirimidina (II.19)



Obtenido bajo condiciones D (64%).

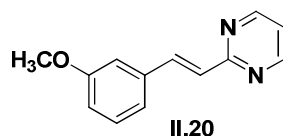
Aceite amarillento.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.72 (2H, d, $J = 5.0$ Hz), 8.32 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 7.66 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 7.35-7.30 (2H, m), 7.08 (1H, t, $J = 5.0$ Hz), 7.00 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 3.92 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 165.5, 158.0, 125.0 (CH) 157.0 (x 2), 133.5, 130.2, 128.2, 128.0, 120.7, 118.3, 111.1 (CH_3) 55.5.

HR ESMS m/z 213.1025 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ 213.1028.

(*E*)-2-(3-metoxiestiril)pirimidina (II.20)



Obtenido bajo condiciones D (60%).

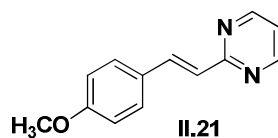
Aceite amarillento.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.72 (2H, d, $J = 5.0$ Hz), 7.96 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 7.31 (1H, t, $J = 8.0$ Hz), 7.30-7.20 (2H, m), 7.16 (1H, br s), 7.10 (1H, t, $J = 5.0$ Hz), 6.90 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz), 3.85 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 164.8, 159.9, 137.3 (CH) 157.0 (x 2), 138.1, 129.7, 127.6, 120.4, 118.5, 115.2, 112.4 (CH_3) 55.2.

HR ESMS m/z 213.1024 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ 213.1028.

(*E*)-2-(4-metoxiestiril)pirimidina (II.21)



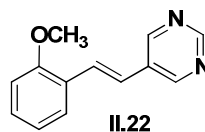
Obtenido bajo condiciones D (51%).

Sólido blanquecino, pf 103-105°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.68 (2H, d, $J = 5.0$ Hz), 7.96 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 7.56 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.12 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 7.05 (1H, t, $J = 5.0$ Hz), 6.92 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 3.82 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 165.2, 160.5, 128.7 (CH) 157.0 (x 2), 137.7, 129.1 (x 2), 125.1, 118.1, 114.2 (x 2) (CH_3) 55.3.

HR ESMS m/z 213.1030 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ 213.1028.

(E)-5-(2-metoxiestiril)pirimidina (II.22)

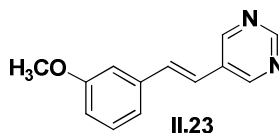
Obtenido bajo condiciones D (62%).

Aceite amarillento.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 9.07 (1H, s), 8.86 (2H, s), 7.59 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 7.57 (1H, dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz), 7.31 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz), 7.05-6.95 (2H, m), 6.94 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 3.91 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 157.3, 131.6, 125.1 (CH) 156.9, 154.2 (x 2), 129.9, 128.0, 127.0, 121.5, 120.8, 111.0 (CH_3) 55.5.

HR ESMS m/z 213.1027 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ 213.1028.

(E)-5-(3-metoxiestiril)pirimidina (II.23)

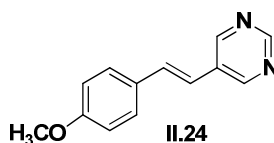
Obtenido bajo condiciones D (59%).

Sólido amarillento pf 75-77°C.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 9.08 (1H, s), 8.82 (2H, s), 7.30 (1H, t, $J = 8.0$ Hz), 7.16 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 7.10 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.05 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 6.88 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz), 3.82 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 159.8, 137.2, 130.7 (CH) 157.0, 154.1 (x 2), 132.5, 129.7, 121.2, 119.3, 114.2, 112.0 (CH_3) 55.1.

HR ESMS m/z 213.1032 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ 213.1028.

(E)-5-(4-metoxiestiril)pirimidina (II.24)

Obtenido bajo condiciones D (60%).

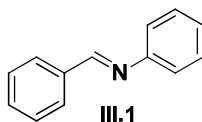
Sólido amarillento, pf 96-98°C.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 8.95 (1H, s), 8.91 (2H, s), 7.54 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.36 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 6.98 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 6.94 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 3.81 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 161.8, 133.7, 130.4 (CH) 156.9, 155.2 (x 2), 134.2, 129.5 (x 2), 119.4, 115.3 (x 2) (CH_3) 55.8.

HR ESMS m/z 213.1023 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ 213.1028.

(E)-N-bencilidenanilina (III.1)

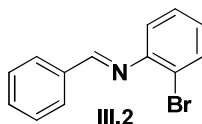


Obtenido bajo condiciones G (99%).

Sólido cristalino blanco, pf 54-55°C (pf lit. 51-51.5°C).³⁵⁸

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁹

(E)-N-benciliden-2-bromoanilina (III.2)



Obtenido bajo condiciones H (34%).

Aceite amarillento.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.37 (1H, s), 7.97 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.64 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.54-7.48 (3H, m), 7.14 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.08 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.03 (1H, d, $J = 7.8$ Hz).

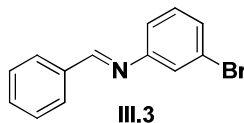
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 150.8, 135.9, 118.0 (CH) 161.7, 133.0, 131.8, 129.1 (x 2), 128.8 (x 2), 128.3, 126.6, 119.7.

IR ν_{max} cm^{-1} 1630 (C=N).

HR ESMS m/z 260.0070 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}^{79}\text{BrN}$ 260.0075.

³⁵⁸ Colinese, D. C. *J. Chem. Soc. B* **1971**, 857-863.

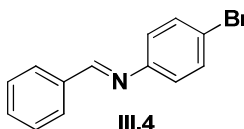
³⁵⁹ da Silva, C. M.; da Silva, D. L.; Martins, C. V. B.; de Resende, M. A.; Dias, E. S.; Magalhaes, T. F. F.; Rodrigues, L. P.; Sabino, A. A.; Alves, R. B.; de Fátima, A. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, 78, 810-815.

(E)-N-benciliden-3-bromoanilina (III.3)

Obtenido bajo condiciones G (99%).

Sólido cristalino blanco, pf 56-57°C (pf lit. 52-52.5°C).³⁶⁰

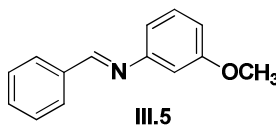
Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁶¹

(E)-N-benciliden-4-bromoanilina (III.4)

Obtenido bajo condiciones G (99%).

Sólido blanco, pf 67-68°C (pf lit. 62.6-63.1°C).³⁶²

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁶³

(E)-N-benciliden-3-metoxianilina (III.5)

Obtenido bajo condiciones H (99%).

Sólido blanquecino, pf 148-150°C (pf lit. 156-157°C).³⁶⁴

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁶⁵

³⁶⁰ Jaunin, C. *Helv. Chim. Acta* **1960**, 43, 2029-2034.

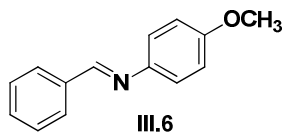
³⁶¹ Xu, J.; Zhuang, R.; Bao, L.; Tang, G.; Zhao, Y. *Green Chem.* **2012**, 14, 2384-2387.

³⁶² Aspinall, H. C.; Greeves, N.; Hin, S. L. F. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 1558-1561.

³⁶³ Al-Rawi, M. A.; Saleem, L. M. N. *Magn. Reson. Chem.* **1989**, 27, 540-543.

³⁶⁴ Suresh, R.; Kamalakkannan, D.; Ranganathan, K.; Arulkumaran, R.; Sundararajan, R.; Sakthinathan, S. P.; Vijayakumar, S.; Sathiyamoorthi, K.; Mala, V.; Vanangamudi, G.; Thirumurthy, K.; Mayavel, P.; Thirunarayanan, G. *Spectrochim. Acta A* **2013**, 101, 239-248.

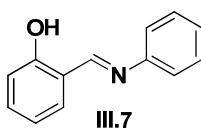
³⁶⁵ Saito, S.; Hatanaka, K.; Yamamoto, H. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1891-1894.

(E)-N-benciliden-4-metoxianilina (III.6)

Obtenido bajo condiciones G (52%).

Sólido cristalino blanco, pf 75-76°C (pf lit. 72-73°C).³⁶⁶

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁶⁷

(E)-2-((fenilimino)metil)fenol (III.7)

Obtenido bajo condiciones I (67%).

Sólido amarillo, pf 49-50°C (pf lit. 51-52°C).³⁶⁸

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁶⁹

(E)-2-(((2-bromofenil)imino)metil)fenol (III.8)

Obtenido bajo condiciones I (92%).

Sólido cristalino amarillo, pf 87-89°C (pf lit. 85-86°C).³⁷⁰

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 8.76 (1H, s), 7.68 (1H, dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz), 7.54 (1H, dd, *J* = 7.7, 2.0 Hz), 7.44-7.40 (2H, br m), 7.20-7.15 (2H, m), 7.00-6.95 (2H, m).

³⁶⁶ Guzen, K. P.; Guarezemini, A. S.; Orfao, A. T. G.; Cella, R.; Pereira, C. M. P.; Stefani, H. A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1845-1848.

³⁶⁷ Axenrod, T.; Huang, X. H.; Wieder, M. J.; Watnick, C. M. *Magn. Reson. Chem.* **1986**, 24, 274-275.

³⁶⁸ Kawato, T.; Amimoto, K.; Maeda, H.; Koyoma, H.; Kanatomi, H. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2000**, 345, 57-62.

³⁶⁹ Alarcón, S. H.; Olivieri, A. C.; González-Sierra, M. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 1067-1070.

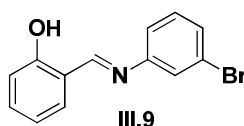
³⁷⁰ Senior, A.; Shepherd, F. G.; Clarke, R. J. *Chem. Soc.* **1912**, 101, 1951.

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) δ (C) 162.2, 148.1, 120.8, 120.6 (CH) 165.3, 134.7, 134.2, 134.0, 129.9, 129.2, 120.5, 120.4, 118.0.

IR ν_{max} cm^{-1} 3300-3000 (br, OH), 1619 (C=N).

HR ESMS m/z 276.0027 ($\text{M}+\text{H}^+$) Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}^{79}\text{BrNO}$ 276.0024.

(E)-2-(((3-bromofenil)imino)metil)fenol (III.9)

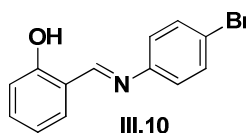


Obtenido bajo condiciones I (95%).

Sólido en forma de agujas amarillas, pf 102-103°C (pf lit. 96-97°C).³⁷¹

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁷²

(E)-2-(((4-bromofenil)imino)metil)fenol (III.10)

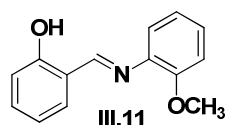


Obtenido bajo condiciones I (70%).

Sólido cristalino amarillo pf 108-110°C (pf lit. 108.5-109.7°C).³⁷³

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁷⁴

(E)-2-(((2-metoxifenil)imino)metil)fenol (III.11)



Obtenido bajo condiciones H (99%).

Sólido blanquecino, pf 53-55°C (pf lit. 58°C).³⁷¹

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.70 (1H, s), 7.40-7.35 (2H, m), 7.25-7.20 (2H, m), 7.05-6.95 (3H, br m), 6.91 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 3.90 (3H, s).

³⁷¹ Senier, A.; Shephard, F. G.; Clarke, R. *J. Chem. Soc* **1912**, 101, 1956.

³⁷² Guo, Y.-N. *Asian J. Chem.* **2013**, 25, 3762-3764.

³⁷³ Kuder, J. E.; Gibson, H. W.; Wychick, D. J. *Org. Chem.* **1975**, 40, 875-878.

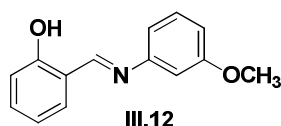
³⁷⁴ Ikram, M.; Rehman, S.; Baker, F. R. J.; Rehman, H. U.; Khan, A.; Chouldhary, M. I.; Rehman, S. U. *Thermochim. Acta* **2013**, 555, 72-80.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 161.6, 153.0, 137.2, 119.6 (CH) 162.2, 132.9, 132.0, 127.9, 121.0, 119.7, 118.7, 117.4, 111.9 (CH_3) 55.9.

IR ν_{max} cm^{-1} 3300-3000 (br, OH), 1618 (C=N).

HR ESMS m/z 228.1021 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_2$ 228.1024.

(E)-2-(((3-metoxifenil)imino)metil]fenol (III.12)



Obtenido bajo condiciones H (99%).

Sólido amarillo, pf 64-66°C (pf lit. 59-60.1°C).³⁷³

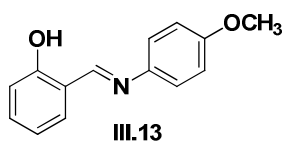
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.61 (1H, s), 7.42-7.37 (2H, m), 7.34 (1H, t, $J = 7.7$ Hz), 7.06 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.96 (1H, t, $J = 7.7$ Hz), 6.90-6.85 (3H, br m), 3.86 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 161.2, 160.5, 149.8, 119.1 (CH) 162.7, 133.2, 132.3, 130.1, 119.0, 117.2, 113.2, 112.6, 107.1 (CH_3) 55.3.

IR ν_{max} cm^{-1} 3300-3000 (br, OH), 1624 (C=N).

HR ESMS m/z 228.1024 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_2$ 228.1024.

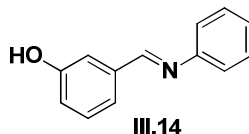
(E)-2-(((4-metoxifenil)imino)metil]fenol (III.13)



Obtenido bajo condiciones I (84%).

Sólido cristalino blanco, pf 87-88°C (pf lit. 82-83.5°C).³⁷³

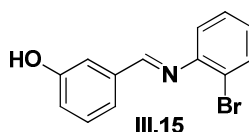
Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁶⁹

(E)-3-[(fenilimino)metil]fenol (III.14)

Obtenido bajo condiciones H (61%).

Sólido blanquecino, pf 95-97°C (pf lit.³⁷⁵ 101-102°C, pf lit.³⁵⁹ 90-91°C).

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁹

(E)-3-[(2-bromofenil)imino]metil]fenol (III.15)

Obtenido bajo condiciones H (79%).

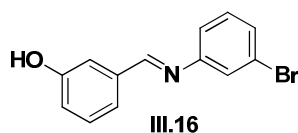
Aceite amarillento.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (1H, s), 7.63 (1H, dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz), 7.50 (1H, br s), 7.39 (1H, br d, *J* ≈ 7.7 Hz), 7.33 (2H, m), 7.08 (1H, dt, *J* = 7.7, 1.5 Hz), 7.02 (2H, m), 5.90 (1H, br s, OH).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (C) 157.2, 150.4, 136.8, 117.8 (CH) 162.4, 132.9, 130.0, 128.3, 126.7, 121.5, 120.1, 119.9, 115.1.

IR ν_{max} cm⁻¹ 3300-3000 (br, OH), 1627 (C=N).

HR ESMS *m/z* 276.0022 (M+H⁺). Calcd. para C₁₃H₁₁⁷⁹BrNO 276.0024.

(E)-3-[(3-bromofenil)imino]metil]fenol (III.16)

Obtenido bajo condiciones I (62%).

Sólido blanco, pf 139-141°C (pf lit.³⁷⁶ 138°C).

³⁷⁵ Billman, J. H.; Diesing, A. C. *J. Org. Chem.* **1957**, *22*, 1068-1070.

³⁷⁶ Nakamura, M.; Komatsu, K.; Gondo, Y.; Ohta, K.; Ueda, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1967**, *15*, 585-592.

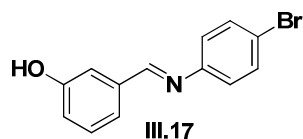
RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.70 (1H, br s, OH), 8.55 (1H, s), 7.46 (1H, t, $J = 2.0$ Hz), 7.42 (1H, br d, $J \approx 7.8$ Hz), 7.38 (1H, br s), 7.35-7.30 (3H, m), 7.25 (1H, br d, $J \approx 7.8$ Hz), 6.96 (1H, br d, $J \approx 7.8$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (C) 157.7, 153.2, 137.1, 122.1 (CH) 162.3, 131.0, 129.8, 128.4, 123.3, 120.7, 120.5, 119.1, 114.5.

IR ν_{max} cm^{-1} 3300-3000 (br, OH), 1619 (C=N).

HR ESMS m/z 276.0023 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}^{79}\text{BrNO}$ 276.0024.

(E)-3-(((4-bromofenil)imino)metil]fenol (III.17)



Obtenido bajo condiciones I (41%).

Sólido blanco, pf 146-147°C (pf lit. 141°C).³⁷⁶

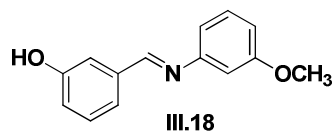
RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.70 (1H, br s, OH), 8.55 (1H, s), 7.58 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.35-7.30 (3H, m), 7.21 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.94 (1H, ddd, $J = 7.5, 2.5, 1.5$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (C) 157.7, 150.6, 137.1, 118.4 (CH) 161.5, 132.0 (x 2), 129.8, 123.2 (x 2), 120.4, 119.0, 114.4.

IR ν_{max} cm^{-1} 3300-3000 (br, OH), 1619 (C=N).

HR ESMS m/z 276.0025 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}^{79}\text{BrNO}$ 276.0024.

(E)-3-(((3-metoxifenil)imino)metil]fenol (III.18)



Obtenido bajo condiciones H (20%).

Sólido amarillo, pf 75-78°C (pf lit. 110°C).³⁷⁶

RMN ^1H (500 MHz, THF- d_8) δ 8.60 (1H, br s, OH), 8.42 (1H, s), 7.40 (1H, s), 7.32 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.27-7.20 (2H, m), 6.89 (1H, dd, $J = 2.5, 1.0$ Hz), 6.78-6.72 (3H, m), 3.78 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, THF- d_8) δ (C) 161.6, 159.0, 154.7, 139.0 (CH) 160.8, 130.4, 130.3, 121.4, 119.4, 115.3, 113.7, 112.2, 107.4 (CH_3) 55.5.

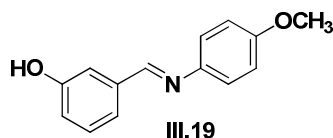
RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (C) 160.0, 157.7, 152.9, 137.3 (CH) 160.8, 129.9, 129.8, 120.3, 118.8, 114.3, 113.2, 111.7, 106.4 (CH_3) 55.2.

IR ν_{max} cm^{-1} 3400-3000 (br, OH), 1580 (C=N).

HR ESMS m/z 228.1022 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_2$ 228.1025.

* El espectro de ^1H en DMSO- d_6 no quedada bien definido, por lo que se hicieron los espectos con THF- d_8 .

(E)-3-(((4-metoxifenil)imino)metil]fenol (III.19)



Obtenido bajo condiciones I (58%).

Sólido en forma de agujas blancas, pf 133-134°C (pf lit. 122°C).³⁷⁶

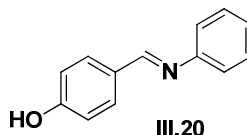
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.40 (1H, s), 7.41 (1H, br s), 7.35 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.29 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.22 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.95-6.90 (3H, m), 6.40 (1H, br s, OH), 3.81 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 158.5, 156.3, 144.4, 137.7 (CH) 158.7, 130.0, 122.3 (x 2), 122.0, 118.7, 114.5 (x 2), 114.3 (CH_3) 55.5.

IR ν_{max} cm^{-1} 3300-3300 (br, OH), 1619 (C=N).

HR ESMS m/z 228.1025 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_2$ 228.1024.

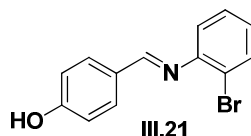
(E)-4-[(fenilimino)metil]fenol (III.20)



Obtenido bajo condiciones I (55%).

Solido cristalino blanco, pf 192-194°C (pf lit. 196-196.5°C).³⁵⁸

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁵⁹

(E)-4-(((2-bromofenil)imino)metil]fenol (III.21)

Obtenido bajo condiciones H (42%).

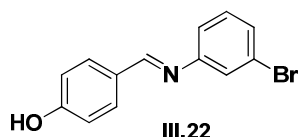
Sólido amarillo, pf 153-154°C (pf lit. 166-167°C).³⁷¹

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.36 (1H, s), 7.80 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.66 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.0 Hz), 7.39 (1H, dt, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 7.16 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz), 7.12 (1H, dt, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 6.90 (2H, d, *J* = 8.7 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (C) 161.1, 150.5, 127.1, 117.7 (CH) 161.5, 132.5, 131.0 (x 2), 128.7, 126.5, 120.2, 115.7 (x 2).

IR ν_{max} cm⁻¹ 3300-3000 (br, OH), 1674 (C=N).

HR ESMS *m/z* 276.0022 (M+H⁺) Calcd. para C₁₃H₁₁⁷⁹BrNO 276.0024.

(E)-4-(((3-bromofenil)imino)metil]fenol (III.22)

Obtenido bajo condiciones I (54%).

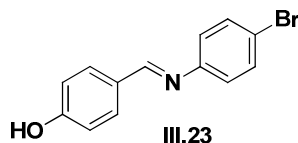
Sólido cristalino blanco, pf 144-146°C (pf lit. 172-173°C).³⁷¹

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.20 (1H, br s, OH), 8.43 (1H, s), 7.80 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.39 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 7.35 (1H, br d, *J* ≈ 8 Hz), 7.29 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.18 (1H, br d, *J* ≈ 8 Hz), 6.93 (2H, d, *J* = 8.7 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (C) 161.0, 153.7, 127.2, 122.1 (CH) 161.3, 131.0 (x 2), 130.9, 127.8, 123.3, 120.4, 115.7 (x 2).

IR ν_{max} cm⁻¹ 3300-3000 (br, OH), 1604 (C=N).

HR ESMS *m/z* 276.0023 (M+H⁺). Calcd. para C₁₃H₁₁⁷⁹BrNO 276.0024.

(E)-4-[[[(4-bromofenil)imino]metil]fenol (III.23)

Obtenido bajo condiciones I (88%).

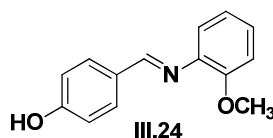
Sólido blanco amarillento, pf 179-181°C (pf lit. 198-198.5°C).³⁵⁸

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 8.40 (1H, s), 7.77 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.50 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.12 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.88 (2H, d, *J* = 8.7 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ (C) 162.6, 152.6, 128.9, 119.8 (CH) 163.1, 133.3 (x 2), 132.2 (x 2), 123.9 (x 2), 116.8 (x 2).

IR ν_{max} cm⁻¹ 3300-3000 (br, OH), 1600 (C=N).

HR ESMS *m/z* 276.0022 (M+H⁺). Calcd. para C₁₃H₁₁⁷⁹BrNO 276.0024.

(E)-4-[[[(2-metoxifenil)imino]metil]fenol (III.24)

Obtenido bajo condiciones G (39%).

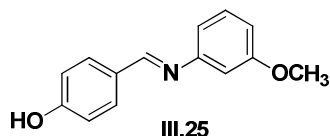
Sólido cristalino amarillo, pf 180-181°C (pf lit. 183-183.5°C).³⁷¹

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.00 (1H, br s, OH), 8.34 (1H, s), 7.74 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.14 (1H, dt, *J* = 7.7, 1.5 Hz), 7.02 (1H, br d, *J* ≈ 7.7 Hz), 6.95-6.90 (2H, m), 6.88 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 3.79 (3H, s).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (C) 160.5, 151.7, 142.0, 127.7 (CH) 160.4, 130.5 (x 2), 125.8, 120.8, 120.2, 115.5 (x 2), 112.0 (CH₃) 55.5.

IR ν_{max} cm⁻¹ 3300-3000 (br, OH), 1617 (C=N).

HR ESMS *m/z* 228.1021 (M+H⁺) Calcd. para C₁₄H₁₄NO₂ 228.1024.

(E)-4-[[[(3-metoxifenil)imino]metil]fenol (III.25)

Obtenido bajo condiciones H (45%).

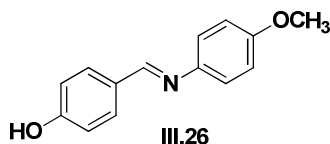
Sólido blanco, pf 173-175°C (pf lit. 193-193.5°C).³⁷¹

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.43 (1H, s), 7.76 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.27 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 6.88 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.80-6.75 (3H, m), 3.79 (3H, s), 3.30 (1H, br s, OH).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (C) 160.7, 160.0, 153.4, 127.4 (CH) 160.1, 130.7 (x 2), 129.8, 115.6 (x 2), 113.1, 111.2, 106.3 (CH₃) 55.1.

IR ν_{max} cm⁻¹ 3300-3000 (br, OH), 1617 (C=N).

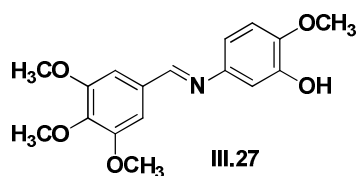
HR ESMS *m/z* 228.1021 (M+H⁺) Calcd. para C₁₄H₁₄NO₂ 228.1024.

(E)-4-[[[(4-metoxifenil)imino]metil]fenol (III.26)

Obtenido bajo condiciones I (56%).

Sólido cristalino amarillo, pf 187-188°C (pf lit. 212.5-213°C).³⁵⁸

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁷⁷

(E)-2-metoxi-5-[(3,4,5-trimetoxibenciliden)amino]fenol (III.27)

Obtenido bajo condiciones G (52%).

Sólido cristalino blanco pf 171-173°C.

³⁷⁷ Bae, S. J.; Ha, Y. M.; Park, Y. J.; Park, J. Y.; Song, Y. M.; Ha, T. K.; Chun, P.; Moon, H. R.; Chung, H. Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 383-390.

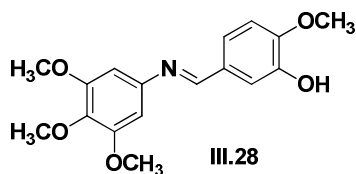
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.34 (1H, s), 7.14 (2H, s), 6.90 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 6.86 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.78 (1H, dd, $J = 8.3, 2.5$ Hz), 5.95 (1H, br s, OH), 3.92 (6H, s), 3.90 (3H, s), 3.88 (3H, s).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (C) 153.5 (x 2), 146.1, 145.5, 145.3, 140.8, 131.8 (CH) 158.3, 113.2, 110.9, 107.1, 105.7 (x 2) (CH_3) 60.9, 56.2 (x 2), 56.1.

IR ν_{max} cm^{-1} 3300 (br, OH), 1620 (C=N).

HR ESMS m/z 318.1344 ($\text{M}+\text{H}^+$). Calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_5$ 318.1341.

(E)-2-metoxi-5-(((3,4,5-trimetofenil)imino)metil]fenol (III.28)



Obtenido bajo condiciones G (42%).

Sólido amarillo, pf 169-170°C (pf lit. 176-178°C).³⁷⁸

Datos espectrales consistentes con la literatura.³⁷⁸

³⁷⁸ Carr, M.; Greene, L. M.; Knox, A. J. S.; Lloyd, D. G.; Zisterer, D. M.; Meegan, M. J. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5752-5766.

CAPÍTULO 4
ENSAYOS BIOLÓGICOS
DE LOS ANÁLOGOS
DE RESVERATROL

CAPÍTULO 4. ENSAYOS BIOLÓGICOS DE LOS ANÁLOGOS DE RESVERATROL

Todos los compuestos sintetizados en la presente Tesis se evaluaron biológicamente como potenciales agentes anticáncer. Nuestro objetivo era que los compuestos sintetizados fueran capaces de dirigirse a dos de las dianas descritas por Hanahan y Weinberg: la angiogénesis y la telomerasa.

Con el término angiogénesis se define el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. Las células tumorales son capaces de estimular a las células endoteliales para que proliferen, se diferencien y formen nuevos vasos sanguíneos dirigidos hacia la zona tumoral. Por otra parte, la telomerasa es la enzima responsable de la capacidad ilimitada de replicación que poseen las células tumorales. Se ha observado que el resveratrol es capaz de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos³⁷⁹ y también es capaz de disminuir la expresión del gen que codifica a la parte proteica de la telomerasa (*hTERT*).³⁸⁰

4.1. Evaluación biológica de estirilfenoles, metoxi(estiril)bencenos y aliloxi(estiril)bencenos

4.1.1. Citotoxicidad

La capacidad citotóxica de los compuestos **I.1-I.9** se midió sobre células de adenocarcinoma de colon (HT-29) y sobre células endoteliales de aorta de bovino (BAEC).

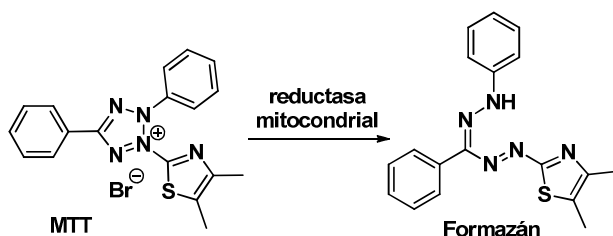
La determinación de los valores de IC₅₀ (concentración de compuesto capaz de inhibir al 50% la proliferación celular) se determinó mediante ensayo con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para ello las células fueron incubadas junto con diferentes concentraciones de compuesto (diluciones seriadas) durante 48 h. Transcurrido dicho tiempo se añadió el MTT y se dejó incubar durante 3 h. Luego se eliminó el medio acuoso y se disolvió el formazán generado en forma de sólido con DMSO. La absorbancia de cada una de las diferentes concentraciones de compuesto fue determinada mediante un lector de microplacas. Posteriormente los

³⁷⁹ Cao, Y.; Fu, Z.-D.; Wang, F.; Liu, H.-Y.; Han, R. J. *Asian Nat. Prod. Res.* **2005**, 7, 205-213.

³⁸⁰ Lanzilli, G.; Fuggetta, M. P.; Tricarico, M.; Cottarelli, A.; Serafino, A.; Falchetti, R.; Ravagnan, G.; Turriziani, M.; Adamo, R.; Franzese, O.; Bonmassar, E. *Int. J. Oncol.* **2006**, 28, 641-648.

datos fueron tratados con el programa *GraphPad Prism4* y se obtuvo el correspondiente valor de IC_{50} . Los ensayos se repitieron al menos tres veces para cada compuesto.

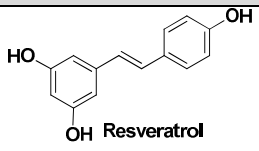
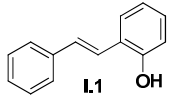
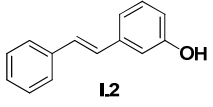
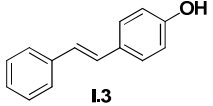
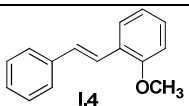
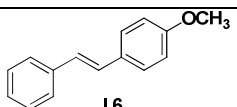
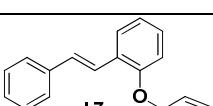
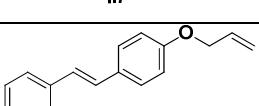
Las células vivas son capaces de reducir el MTT a través de las enzimas mitocondriales succinato-deshidrogenasas. El MTT pasa de ser un sólido soluble en medio acuoso de coloración amarilla, a ser un sólido insoluble en medio acuoso de coloración morada. De este modo, la cantidad de sólido morado que aparece en el pocillo tras tres horas de incubación es proporcional a la cantidad de células vivas presentes en el pocillo para cada compuesto y cada concentración ensayados. Así, la lectura de absorbancia es proporcional a la cantidad de células vivas presentes. En el esquema 4.1 puede verse la reacción que sufre el MTT en el interior de la célula que transforma el MTT a formazán.



Esquema 4.1. Metabolización celular del MTT.

En la tabla 4.1 se reúnen los valores de IC_{50} calculados para los compuestos **I.1-I.4**, **I.6-I.7** y **I.9** en la línea celular tumoral HT-29 y en la no tumoral BAEC tras 48 horas de incubación. Los compuestos **I.5** y **I.8** no fueron evaluados biológicamente ya que su síntesis fue posterior al resto de productos de la misma familia sintética. También se incluyen los resultados obtenidos para el resveratrol, compuesto que se utilizó como referencia en todos los ensayos realizados. Los valores del coeficiente α se obtienen al dividir el valor de IC_{50} de la línea no tumoral BAEC entre los valores de IC_{50} de la línea tumoral HT-29. Un valor alto de α indica que el compuesto en cuestión es mucho más tóxico para la línea celular tumoral que para la línea celular no tumoral.

Tabla 4.1. Valores de IC₅₀ (μg/mL) a 48 h y coeficiente α de los compuestos I.1-I.9^a

Compuesto	HT-29	BAEC	α
 Resveratrol	25 ± 3	11 ± 1	0,4
 I.1	22 ± 3	21 ± 3	0,9
 I.2	24,9 ± 1,0	18 ± 2	0,7
 I.3	6,8 ± 0,4	6,6 ± 0,5	1
 I.4	9,0 ± 1,0	32 ± 4	3,5
 I.6	5,5 ± 0,5	88 ± 19	16
 I.7	13,0 ± 0,9	74 ± 7	5,7
 I.9	5,4 ± 0,7	>100	>18,5

^a Los compuestos I.5 y I.8 no se ensayaron biológicamente.

Los compuestos sintéticos muestran una actividad citotóxica media-baja en el rango micromolar en la línea celular HT-29. Los más citotóxicos son los compuestos I.3, I.6 y I.9 (6,8, 5,5 y 5,4 μg/mL, respectivamente), con valores de citotoxicidad menores que los del propio resveratrol (25 μg/mL). El rasgo común a estos tres compuestos es la presencia de la función hidroxilo, metoxilo y alilo en posición *para*.

Las células BAEC no son tumorales y por ello lo ideal es que el compuesto muestre una baja citotoxicidad en esta línea celular. En la columna de la derecha de la tabla

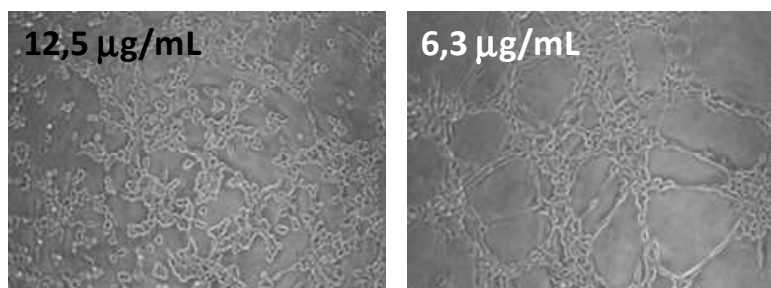
4.1 se han indicado los valores α , así, cuanto más alto sea el valor de α , mayor será el margen terapéutico del compuesto. Los compuestos con mayores coeficientes α son **I.4, I.6, I.7 y I.9** (3,5, 16, 5,7 y 18,5, respectivamente), lo que permitiría emplear estos compuestos en concentraciones tóxicas para las células tumorales pero relativamente inocuas para las endoteliales.

4.1.2. Inhibición en la formación de tubos en células BAEC

En este ensayo se estudió la capacidad de los compuestos de inhibir la diferenciación de las células endoteliales y la formación de microtubos mediante el ensayo de la tubulogénesis. El estudio se efectuó cultivando las células endoteliales BAEC sobre Matrigel. La Matrigel es una mezcla gelatinosa de proteínas que genera unas condiciones semejantes a las del entorno extracelular que se encuentra en muchos tejidos. El cultivo de las células endoteliales sobre Matrigel permite su proliferación, su diferenciación y la formación de una red de formas circulares o microtubos. Si las células endoteliales se cultivan sobre Matrigel en presencia de un inhibidor de la tubulogénesis, las células no se diferencian y crecen de manera individual sin formar red alguna.

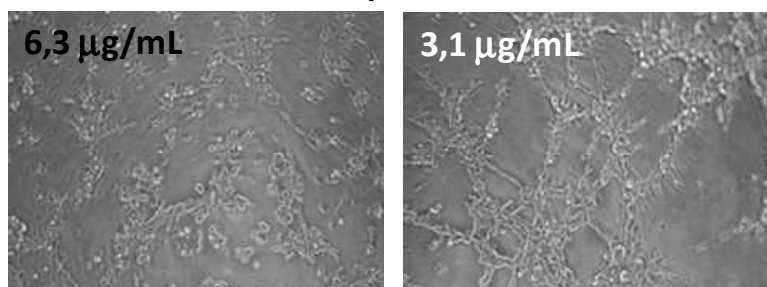
Para realizar el ensayo de tubulogénesis las células BAEC se cultivaron sobre Matrigel durante 24 horas en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. Transcurrido dicho tiempo, se fotografiaron las células obteniéndose las imágenes que se muestran a continuación.³⁸¹

Resveratrol

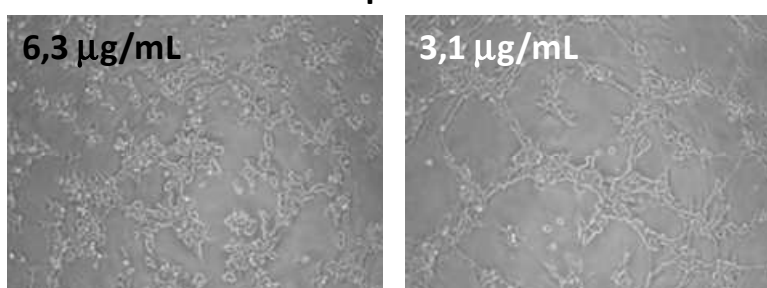


³⁸¹ Estos ensayos se efectuaron en la empresa Drug Discovery Biotech, S. L. (Málaga).

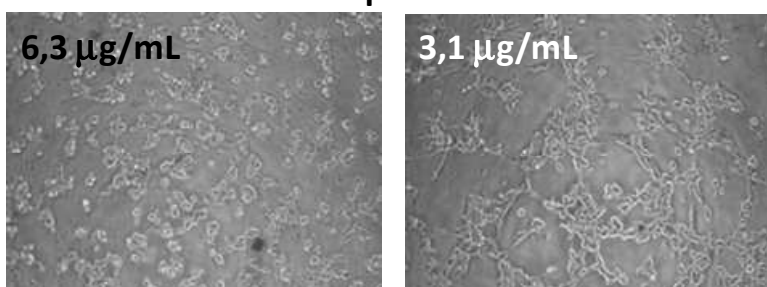
Compuesto I.1

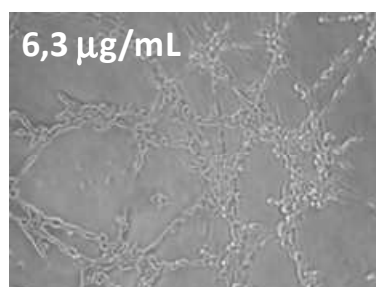
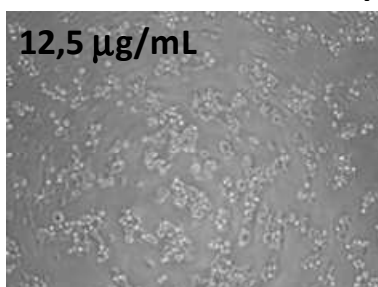
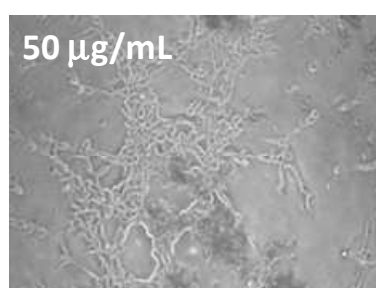
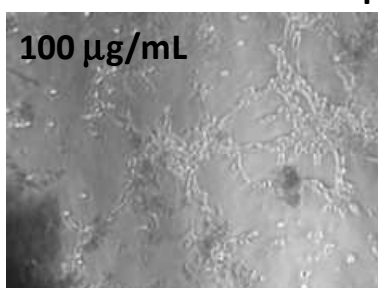
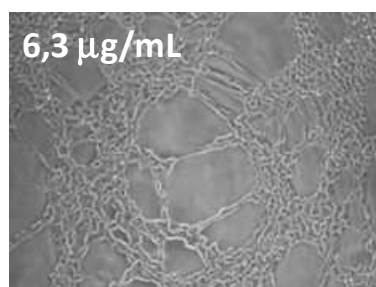
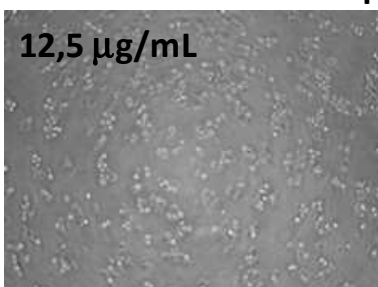


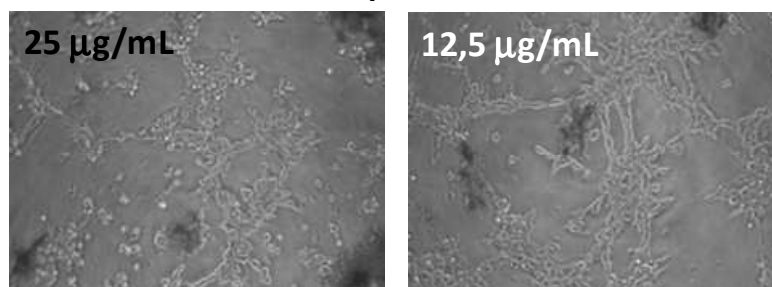
Compuesto I.2



Compuesto I.3



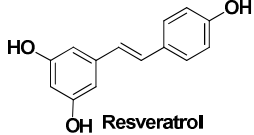
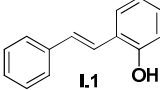
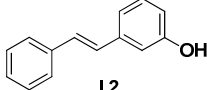
Compuesto I.4**Compuesto I.6****Compuesto I.7**

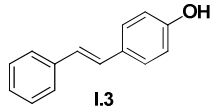
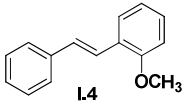
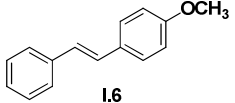
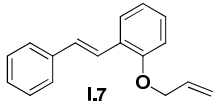
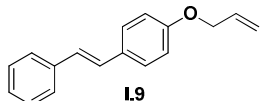
Compuesto I.9

En las figuras anteriores se muestra en color negro la concentración mínima inhibitoria (MIC) de formación de microtubos en células BAEC (imagen de la izquierda), mientras que la concentración que se muestra en color blanco (imagen de la derecha) permite la formación de microtubos o redes cerradas. A modo de ejemplo, para el resveratrol se observa que a una concentración de 12,5 µg/mL el compuesto inhibe la formación de tubos, observándose en la imagen la agrupación de células individuales. Sin embargo, a una concentración de 6,3 µg/mL la formación de microtubos es completa. Por ello se elige como MIC la concentración de 12,5 µg/mL. Para la determinación del valor de MIC del resto de compuestos se siguió la misma metodología.

En la tabla 4.2 se reúnen las concentraciones MIC junto con los valores de citotoxicidad sobre células BAEC para los compuestos **I.1-I.4**, **I.6-I.7** y **I.9** y el resveratrol.

Tabla 4.2. Valores de IC₅₀ (µg/mL) y de MIC sobre células BAEC para los compuestos **I.1-I.9**^a

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)	MIC (µg/mL)
 Resveratrol	11 ± 1	12,5
 I.1	21 ± 3	6,3
 I.2	18 ± 2	6,3

 I.3	$6,6 \pm 0,5$	6,3
 I.4	32 ± 4	12,5
 I.6	88 ± 19	100
 I.7	74 ± 7	12,5
 I.9	>100	25

^a Los compuestos I.5 y I.8 no se ensayaron biológicamente.

Los compuestos I.1, I.2, I.3, I.4, I.7 y I.9 son capaces de inhibir la formación de microtubos a concentraciones inferiores a las citotóxicas para la línea celular BAEC, mostrando de este modo su potencial capacidad antiangiogénica. De entre los compuestos anteriores, los compuestos I.1, I.2 y I.3 son capaces de inhibir la formación de microtubos a concentraciones relativamente bajas e inferiores a las del resveratrol.

4.1.3. Ensayo de inhibición de la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en células HT-29

Con el fin de estudiar si los compuestos sintetizados eran capaces de inhibir la secreción de VEGF en células tumorales, se determinó de forma cuantitativa la cantidad de proteína VEGF-A₁₆₅ que las células tumorales HT-29 secretaban al medio de cultivo al ser tratadas con cada uno de los compuestos estudiados.

Uno de los métodos utilizados para identificar nuevos compuestos antiangiogénicos es la determinación de la cantidad de VEGF-A₁₆₅ que las células secretan al medio de cultivo tras ser sometidas a la acción de éstos. La proteína secretada puede ser medida mediante el ensayo ELISA (*Enzyme-Linked*

ImmunoSorbent Assay). La técnica ELISA es un inmunoensayo en el que un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable. En nuestro caso se utilizó la técnica ELISA tipo *sándwich*. En ella se utiliza un anticuerpo policlonal insolubilizado anclado a un soporte sólido. La interacción de éste con el antígeno forma un conjugado antígeno-anticuerpo inmovilizado. El antígeno es reconocido por un anticuerpo monoclonal secundario que lleva enlazado una enzima, cuya reacción con un sustrato específico produce un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (véase la figura 4.1).

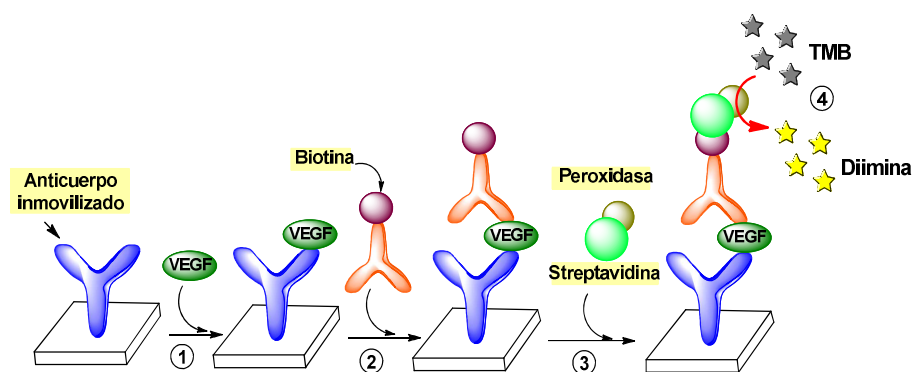


Figura 4.1. Etapas del ensayo ELISA.

El test ELISA para la determinación de VEGF se lleva a cabo siguiendo los siguientes pasos:

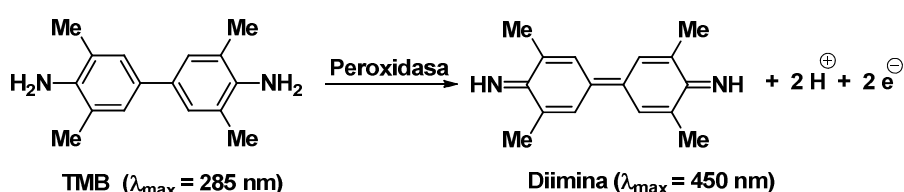
1) Una alícuota del medio de cultivo, en que se han incubado las células tratadas previamente con el correspondiente compuesto a una concentración conocida y que por tanto contiene proteína VEGF, se añade sobre un anticuerpo policlonal inmovilizado sobre un soporte sólido capaz de reconocer el VEGF (paso 1 de la figura 4.1). El anticuerpo reconoce el VEGF humano que pueda estar presente en el medio de cultivo, formándose un complejo anticuerpo-antígeno que queda inmovilizado en el soporte sólido.

2) El complejo anticuerpo-antígeno se trata con un anticuerpo monoclonal biotinilado, el cual se une a la proteína VEGF inmovilizada en el soporte sólido (paso 2 de la figura 4.1), formando de este modo una estructura tipo *sándwich*, quedando libre la biotina.

3) Se añade una enzima de tipo peroxidasa (HRP) conjugada con estreptavidina (paso 3 de la figura 4.1). La estreptavidina es una proteína, aislada de la bacteria

Streptomyces avidinii, que presenta una elevada afinidad por la biotina. Esta elevada afinidad es la que permite anclar la enzima peroxidasa al anticuerpo biotinilado del conjugado formado por los dos anticuerpos y el VEGF.

4) Se añade una disolución acuosa de tetrametilbencidina (TMB) incolora, que en medio ácido es oxidada por la enzima peroxidasa a la correspondiente diimina de coloración amarilla (paso 4 de la figura 4.1, véase la reacción en el esquema 4.2).³⁸² La medida de la absorbancia de la disolución coloreada es directamente proporcional a la concentración de VEGF presente en la muestra y puede ser leída con un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm. De modo que la cantidad de absorbancia medida será proporcional a la cantidad de VEGF presente en la muestra.



Esquema 4.2. Oxidación de la tetrametilbencidina a diimina.

Para medir la inhibición de la secreción de la proteína VEGF se escogieron, junto con el resveratrol, los compuestos *orto*-sustituídos **I.1**, **I.4** y **I.7**, que eran los que habían mostrado mejores valores de MIC.

Para determinar la cantidad de proteína VEGF que las células secretaban al medio de cultivo, se incubaron células HT-29 en presencia de 10 µg/mL de cada uno de los compuestos seleccionados, incluyendo al resveratrol, durante 72 h. Transcurrido dicho tiempo se recogió el medio de cultivo y se determinó la cantidad de proteína VEGF-A₁₆₅ presente en el mismo utilizando la técnica ELISA. Los valores obtenidos se compararon con los de un control de células tratadas únicamente con DMSO.

Los resultados obtenidos para los ensayos ELISA a 72 h en células HT-29, utilizando una concentración de 10 µg/mL para cada uno de los compuestos ensayados, se muestran en la figura 4.2.

³⁸² Josephy, P. D.; Elin, T.; Mason, R. P. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 3669-3675.

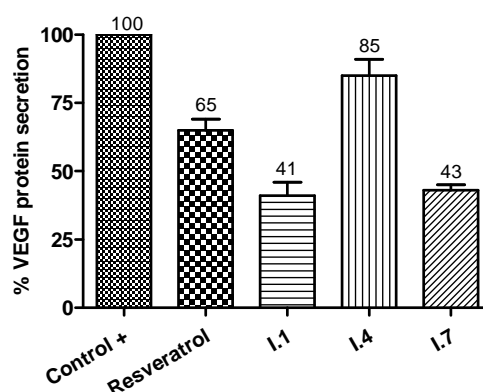


Figura 4.2. Porcentaje de secreción de la proteína VEGF en células HT-29.

Los compuestos con mayor poder inhibitorio fueron el **I.1** y el **I.7**. Concretamente el compuesto **I.1** es el que más inhibe la secreción de la proteína VEGF, con una inhibición del 59%. Este hecho, sumado a su alta capacidad de inhibición de la formación de tubos en células BAEC (valor MIC de 6,3 $\mu\text{g/mL}$) hace que el compuesto **I.1** sea, *a priori*, un potencial agente antiangiogénico. El aliloxiestilbeno **I.7** inhibe la secreción de VEGF un 57%, una cifra similar a la que exhibe el compuesto **I.1**, aunque el valor MIC de **I.7** es de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, superior al del compuesto **I.1**.

4.1.4. Ensayo de inhibición de la expresión del gen *VEGF* en células HT-29

La eventual inhibición de la expresión del gen *VEGF-A* por parte de los compuestos anteriores, se llevó a cabo sobre células HT-29. La medición de la expresión del gen se llevó a cabo con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) sirve como forma indirecta para determinar de manera cuantitativa o semicuantitativa la expresión de un gen. La técnica de la PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1984 y su objetivo es la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN. El proceso consta de varias etapas marcadas por diferentes ciclos de temperatura. En la primera de ellas tiene lugar la desnaturalización del ADN y ocurre entre los 95°C y los 97°C. En este proceso se separa la doble hebra del ADN, quedándose una hebra sencilla. A continuación se baja la temperatura a 55-60°C para que tenga lugar el apareamiento. En este proceso los *primers* o cebadores reconocen el fragmento plantilla e

interaccionan con la hebra sencilla, quedándose unidos a ella. Finalmente, la temperatura se sube a unos 70°C y la enzima polimerasa extiende los cebadores mediante la incorporación de los dNTPs (trifosfato de desoxinucleósidos) correspondientes en dirección 5'→3'. De esta forma, se sintetiza la secuencia complementaria de las hebras de ADN molde. De modo que, en cada ciclo, se duplican cada una de las hebras de ADN que reconocen los cebadores. Estas etapas o ciclos se repiten n veces, haciendo que la cantidad de ADN aumente a 2^n y pueda detectarse, e incluso cuantificarse, la cantidad de gen presente en la muestra.

Una vez se ha amplificado el gen mediante PCR, éste se purifica mediante electroforesis horizontal empleando un gel de agarosa al 1%. En esta técnica, la agarosa funciona como una malla molecular capaz de separar fragmentos de ADN en función de su tamaño. El ADN amplificado se carga en un gel de agarosa, que se sitúa en una cubeta rellena con una disolución tampón conductora. La corriente pasa a través de electrodos situados en cada extremo de la cubeta. Los fragmentos de ADN están cargados negativamente y cuando se sitúan en un campo eléctrico migran hacia el polo positivo. La matriz del gel de agarosa actúa como una malla molecular a través del cual los fragmentos pequeños de ADN se pueden mover con más facilidad que los grandes. Una vez se ha terminado la elución, el gel se trata con bromuro de etidio, un agente intercalante de ADN que emite luz al ser expuesto a radiación ultravioleta. De esta manera pueden observarse una serie de bandas de diferente intensidad que corresponden a diferentes fragmentos de ADN amplificados. La intensidad de las bandas es proporcional a la cantidad de ADN que contienen.

La inhibición de la expresión del gen *VEGF-A* provocada por el resveratrol y los compuestos **I.1**, **I.4** y **I.7** se midió mediante la técnica de PCR convencional que se acaba de explicar. Para llevar a cabo los ensayos, las células HT-29 se incubaron en presencia de 10 µg/mL de cada uno de los compuestos seleccionados, incluyendo el resveratrol, durante 48 h. Transcurrido dicho tiempo, se recogieron las células, se extrajo su ARN, se retrotranscribió a ADN y posteriormente se amplificó el gen *VEGF-A* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La β -actina, cuyo gen también se amplificó, se utilizó como control endógeno y los resultados se compararon respecto a una muestra control de células tratadas con DMSO. Finalmente, los genes amplificados se purificaron mediante electroforesis horizontal empleando gel de agarosa al 1% y se detectaron mediante luz ultravioleta, empleando el bromuro de etidio como agente intercalante, para obtener de modo semi-cuantitativo la cantidad de gen *VEGF-A* expresado.

En la figura 4.3 se muestran las bandas de los genes *VEGF-A* y de la β -actina amplificados para cada muestra. El grado de expresión génica se cuantificó usando el programa *Image J*, utilizando como gen de referencia o endógeno la β -actina. Los valores se normalizaron en base a los datos recogidos a partir de una muestra de células tratadas únicamente con DMSO.

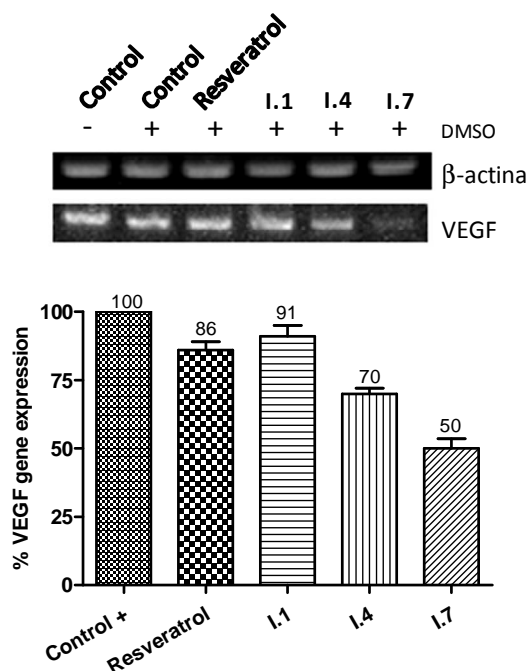


Figura 4.3. Porcentaje de expresión del gen *VEGF* mediante ensayo de PCR y gel de agarosa.

Los resultados de este estudio muestran que el resveratrol inhibe muy poco la expresión del gen *VEGF-A*, con un valor de tan solo el 14%. El compuesto **I.7** es el que provoca mayor inhibición del gen *VEGF-A*, con una cifra de inhibición del 50%. El compuesto **I.4**, con un valor de inhibición del 30%, es mucho menos activo que el **I.7**, pero mucho más que el resveratrol. El compuesto menos activo de los cuatro ensayados es el **I.1**, que solo inhibe un 9% la expresión del gen.

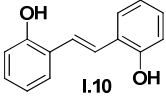
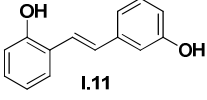
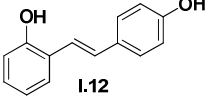
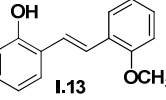
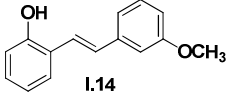
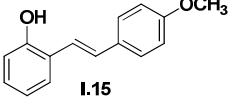
En conclusión, el compuesto que combina los mejores resultados de inhibición es el **I.7** ((*E*)-1-(aliloxi)-2-estirilbenceno) ya que exhibe un valor MIC de 12,5 μ g/mL, un valor α de 5,7, y es capaz de inhibir un 57% la secreción de la proteína VEGF y un 50% la expresión del gen *VEGF*.

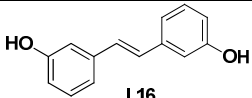
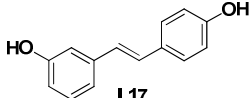
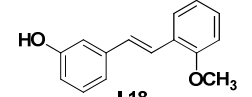
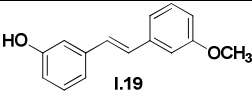
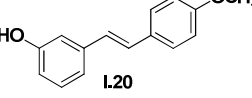
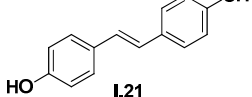
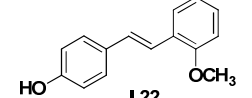
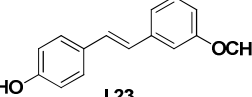
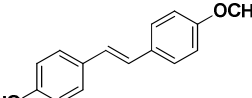
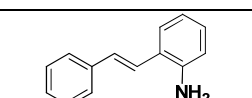
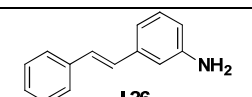
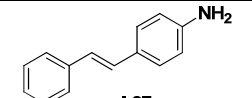
4.2. Evaluación biológica de (hidroxiestiril)fenoles, (metoxiestiril)-fenoles, estirilanilinas y *N*-acil(estiril)anilinas

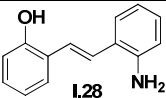
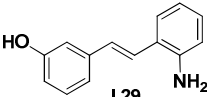
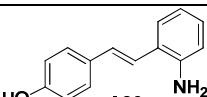
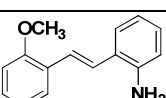
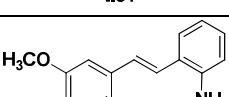
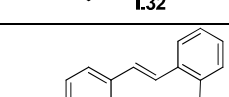
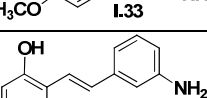
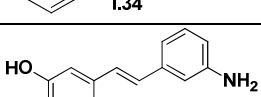
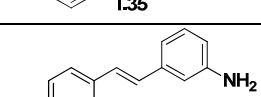
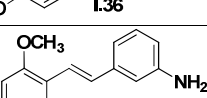
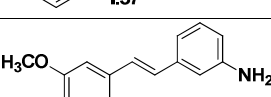
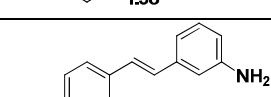
4.2.1. Citotoxicidad

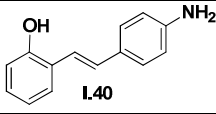
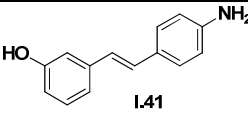
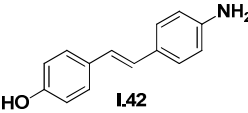
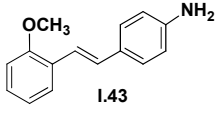
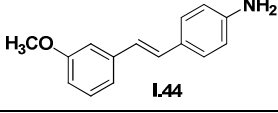
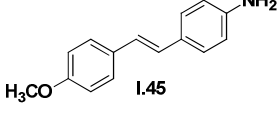
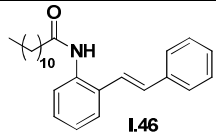
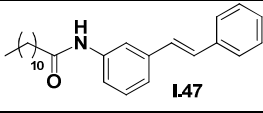
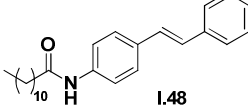
La primera actividad biológica que se midió sobre los compuestos **I.10-I.48** fue su capacidad citotóxica. La citotoxicidad de los compuestos, junto con la del resveratrol, se evaluó en las líneas celulares tumorales HT-29 (adenocarcinoma de colon) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y en la línea celular no tumoral HEK-293 (células embrionarias de riñón). Los valores de IC_{50} obtenidos mediante ensayo con MTT se indican en la tabla 4.3. También se muestran en esta tabla los coeficientes α y β , valores que se obtienen al dividir el valor de IC_{50} de la línea no tumoral HEK-293 entre los valores de IC_{50} de las líneas tumorales HT-29 y MCF-7, respectivamente. Valores altos de α o β indican que el compuesto en cuestión es mucho más tóxico para la línea celular tumoral que para la línea celular no tumoral.

Tabla 4.3. Valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a 48 h y coeficientes α y β de los compuestos **I.10-I.48**

Compuesto	HT-29	MCF-7	HEK-293	α	β
Resveratrol	34,1 \pm 1,4	16,1 \pm 1,1	7,1 \pm 1,0	0,21	0,44
 I.10	25 \pm 7	23,0 \pm 1,3	24,3 \pm 2,3	0,97	1,06
 I.11	27 \pm 7	20,1 \pm 2,1	18 \pm 8	0,67	0,90
 I.12	22 \pm 9	21 \pm 3	17,5 \pm 1,5	0,8	0,8
 I.13	23 \pm 6	17,9 \pm 2,4	15,0 \pm 2,5	0,65	0,84
 I.14	26 \pm 3	18 \pm 4	20 \pm 4	0,8	1,1
 I.15	10 \pm 4	17 \pm 6	21 \pm 4	2,1	1,2

 I.16	$25,9 \pm 1,0$	21 ± 6	21 ± 5	0,8	1
 I.17	$6,9 \pm 1,9$	23 ± 3	$1,1 \pm 0,7$	0,16	0,05
 I.18	17 ± 4	$24,3 \pm 1,0$	24 ± 3	1,4	1
 I.19	$11,5 \pm 3$	13 ± 3	19 ± 7	1,6	1,5
 I.20	22 ± 4	21 ± 5	24 ± 3	1,1	1,1
 I.21	>100	$6,83 \pm 0,20$	$1,2 \pm 0,1$	<0,01	0,2
 I.22	24 ± 3	19 ± 4	41 ± 3	1,7	2,2
 I.23	26 ± 4	$21,0 \pm 1,5$	24 ± 3	0,9	1,1
 I.24	$17,37 \pm 0,2$	$11,3 \pm 2,3$	$3,9 \pm 0,5$	0,22	0,35
 I.25	17 ± 4	$1,4 \pm 0,023$	$1,29 \pm 0,21$	0,076	0,91
 I.26	$12,9 \pm 0,9$	14 ± 4	84 ± 11	6,5	6
 I.27	$4,4 \pm 1,1$	$16 \pm 0,06$	$11,4 \pm 0,4$	2,6	0,7

 I.28	36 ± 5	39 ± 3	27 ± 7	0,7	0,7
 I.29	30 ± 5	17 ± 3	20 ± 7	0,7	1,2
 I.30	>100	79 ± 3	7 ± 3	<0,1	0,1
 I.31	>100	>100	$2,1 \pm 0,7$	<0,02	<0,02
 I.32	$21,2 \pm 1,5$	$6,1 \pm 1,8$	$0,5 \pm 0,12$	0,02	0,1
 I.33	73 ± 5	$0,4 \pm 0,08$	$0,6 \pm 0,12$	0,01	1,4
 I.34	$30,4 \pm 1,8$	$24,7 \pm 0,23$	96 ± 15	3,2	3,9
 I.35	43 ± 16	54 ± 7	>100	>2,3	>1,8
 I.36	51 ± 16	6 ± 3	7 ± 3	0,14	1,2
 I.37	$25,3 \pm 0,1$	$38,7 \pm 0,6$	$45 \pm 0,3$	1,8	1,2
 I.38	$19,6 \pm 2,0$	34 ± 5	16 ± 5	0,8	0,5
 I.39	$16,3 \pm 0,4$	23 ± 4	$11 \pm 0,3$	0,7	0,5

 I.40	37 ± 5	23 ± 4	$21,4 \pm 1,4$	0,6	1
 I.41	42 ± 6	$24,8 \pm 0,4$	25 ± 8	0,6	1
 I.42	$30,6 \pm 2,4$	$2,2 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,12$	0,03	0,38
 I.43	22 ± 4	$3,2 \pm 1,7$	$1,0 \pm 0,3$	0,05	0,31
 I.44	$16,1 \pm 0,09$	52 ± 6	18 ± 4	1,12	0,35
 I.45	$3,6 \pm 1,5$ (ng/mL)	$2,1 \pm 0,5$ (ng/mL)	12 ± 4 (ng/mL)	3,33	5,71
 I.46	$2,5 \pm 0,7$	$12,0 \pm 0,9$	16 ± 9	6,4	1,33
 I.47	>100	$3,5 \pm 0,5$	$11,6 \pm 0,6$	<0,012	3,31
 I.48	>100	$5,8 \pm 0,023$	10 ± 4	<0,1	1,72

La mayoría de los estilbenos de la tabla 4.3 muestran un valor de IC_{50} en el rango micromolar en las diferentes líneas celulares ensayadas. Cabe destacar al compuesto **I.45**, pues presenta actividad en el rango nanomolar y unos coeficientes α y β mayores a la unidad, por lo que presenta un buen margen de seguridad terapéutica.

En relación con la línea celular HT-29, además del compuesto **I.45**, también son destacables los compuestos **I.27** y **I.46**, pues presentan valores relativamente bajos de IC_{50} (4,4 y 2,5 μ g/mL, respectivamente) y valores altos de α (2,6 y 6,4,

respectivamente). El compuesto **I.17** también presenta un valor relativamente bajo de IC_{50} en la línea celular HT-29 (6,9 $\mu\text{g/mL}$) pero su índice α (0,16) es mucho menor que el de los dos compuestos anteriores.

Por lo que respecta a la línea celular MCF-7, y aparte del compuesto **I.45**, también son destacables los compuestos **I.33**, **I.36**, **I.47** y **I.48**, pues presentan valores relativamente bajos de IC_{50} (0,4, 6, 3,5 y 5,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) y valores altos en el coeficiente β (1,4, 1,2, 3,31 y 1,72, respectivamente). Los compuestos **I.21**, **I.25**, **I.32**, **I.42** y **I.43** exhiben valores relativamente bajos de IC_{50} (6,83, 1,4, 6,1, 2,2 y 3,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) pero presentan poca o ninguna selectividad hacia las células tumorales MCF-7 frente a las no tumorales HEK-293, ya que sus índices β son inferiores a la unidad (0,2, 0,91, 0,1, 0,38 y 0,31, respectivamente).

En la figura 4.4 se representan los valores de β frente a α de los compuestos que contienen un grupo hidroxilo en posición *orto* (2'-OH). Las líneas punteadas generan un área superior derecha en la cual los valores conjuntos de α y β son superiores a la unidad. Los únicos compuestos que están dentro de esta zona son **I.15** y **I.34**.

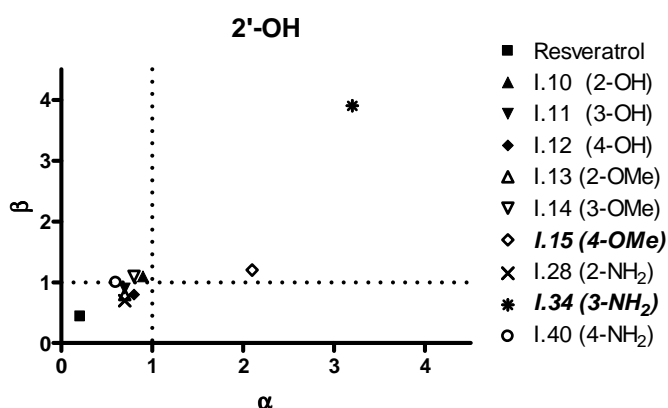


Figura 4.4. Coeficientes β/α de compuestos con grupo hidroxilo en *orto* (2'-OH).

En la figura 4.5 se representan los valores de β frente a α de los compuestos que contienen un grupo hidroxilo en posición *meta* (3'-OH). En el área superior derecha se encuentran los compuestos **I.18**, **I.19**, **I.20** y **I.35**.

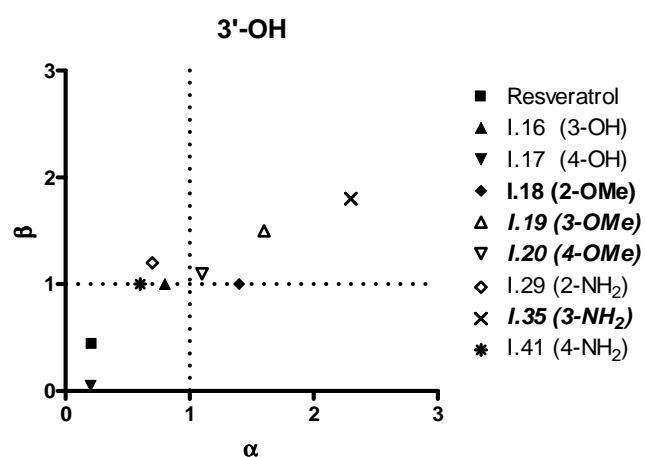


Figura 4.5. Coeficientes β/α de compuestos con grupo hidroxilo en *meta* (3'-OH).

En la figura 4.6 se representan los valores de β frente a α de los compuestos que contienen un grupo hidroxilo en posición *para* (4'-OH). En el área superior derecha se encuentra el compuesto **I.22**.

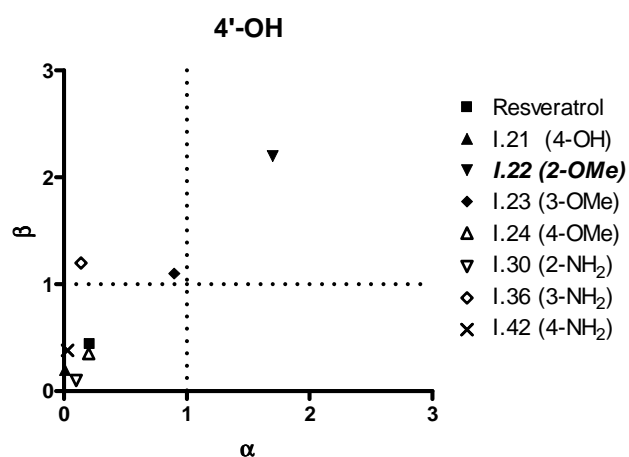


Figura 4.6. Coeficientes β/α de compuestos con grupo hidroxilo en *para* (4'-OH).

En la figura 4.7 se representan los valores de β frente a α del resto de compuestos. En el área superior derecha se encuentran los compuestos **I.26**, **I.37**, **I.45** y **I.46**.

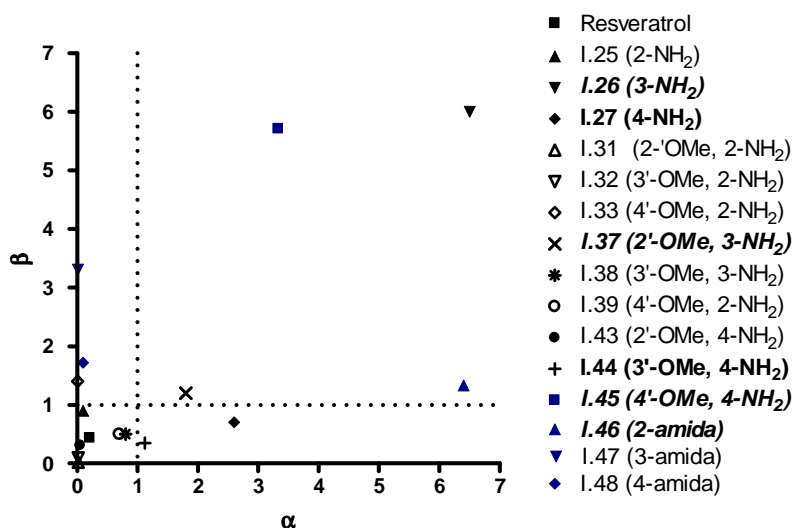


Figura 4.7. Coeficientes β/α del resto de compuestos.

El análisis de estos resultados pone de manifiesto que, probablemente, el compuesto **I.45**, con valores de IC_{50} en el rango nanomolar, presente un modo de acción diferente a la del resto de compuestos, cuyos valores de IC_{50} se encuentran en el rango micromolar. Teniendo en cuenta esto, se puede establecer que los derivados estilbénicos que poseen un grupo amino en posición *meta* poseen una mayor margen terapéutico en las dos líneas celulares tumorales respecto a las células HEK-293, independientemente del grupo existente en el otro anillo, resultado que puede verificarse en los compuestos **I.26**, **I.34**, **I.35** y **I.37**.

Los valores de IC_{50} y los índices α y β mostrados en la tabla 4.3 se emplearon en el cribado de los compuestos para estudios posteriores. Así, para ensayos posteriores se eligieron los compuestos **I.15**, **I.18**, **I.19**, **I.20**, **I.22**, **I.26**, **I.34**, **I.35**, **I.37**, **I.45** y **I.46**, que muestran citotoxicidades selectivas hacia las líneas tumorales HT-29 y MCF-7 y, por tanto, coeficientes de selectividad α y β superiores a la unidad. Además de los compuestos anteriores, también se seleccionaron los compuestos **I.27** y **I.44**, pues aunque sus valores β son inferiores a la unidad (0,7 y 0,35, respectivamente) su coeficiente α es relativamente elevado (2,6 y 1,12, respectivamente).

Además de los compuestos indicados en el párrafo anterior, también se seleccionaron los compuestos **I.25**, **I.32**, **I.38** y **I.39**, ya que todos ellos muestran un valor de IC_{50} inferior al mostrado por el resveratrol en la línea celular HT-29.

Atendiendo a los valores de citotoxicidad obtenidos en la línea celular HT-29, se decidió trabajar en los ensayos posteriores con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de compuesto. Para los compuestos **I.27** y **I.46** se trabajó con 2 $\mu\text{g/mL}$, a fin de utilizar valores de concentración por debajo de su IC_{50} . El compuesto **I.45** presenta un IC_{50} en el rango nanomolar en todas las líneas celulares ensayadas, por lo que se decidió hacer un estudio más intensivo de este producto. Para este compuesto se trabajó con concentraciones de 1, 2 y 3 ng/mL en la línea celular HT-29 y 1 y 2 ng/mL en la línea celular MCF-7, de acuerdo con sus valores de IC_{50} en cada línea celular.

4.2.2. Estudio de la inhibición de la proliferación celular

La proliferación celular se refiere al porcentaje de células que sobreviven a la acción de un compuesto determinado tras un determinado tiempo de incubación. Así, para comprobar la correcta elección de las concentraciones de trabajo, se realizó el ensayo de proliferación celular sobre células HT-29 a 48 y 72 horas. Para ello, se incubaron las células junto con los compuestos a 10 $\mu\text{g/mL}$ de concentración, excepto para **I.27** y **I.46** que la concentración fue de 2 $\mu\text{g/mL}$ y para **I.45** que fue de 1, 2 y 3 ng/mL , durante 48 o 72 horas. Transcurrido dicho tiempo, se recogieron las células y se contó la densidad celular que había en cada uno de los pocillos utilizando la cámara de Neubauer y se obtuvo el porcentaje de proliferación celular respecto al control positivo de DMSO utilizado como referencia. Los resultados del ensayo se muestran en la figura 4.8.

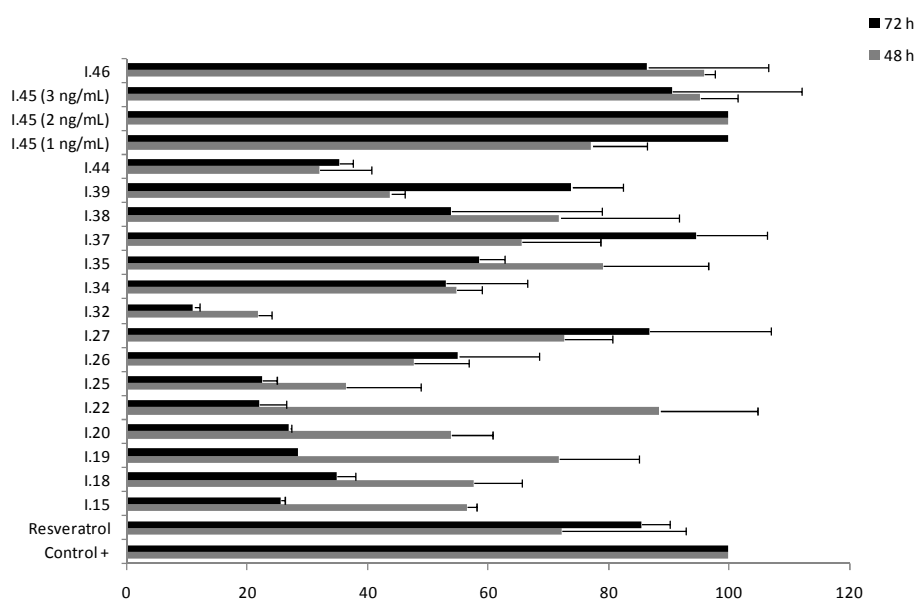


Figura 4.8. Proliferación celular sobre células HT-29.

Lo primero que llama la atención en estos resultados es que no todos los compuestos son capaces de permitir la proliferación celular más del 50%, a pesar de emplear concentraciones inferiores a su valor de IC_{50} . Concretamente, el producto **I.32** no es capaz de permitir la proliferación celular superior al 50% ni a 48 horas ni a 72 horas. Además, los productos **I.15**, **I.18**, **I.19**, **I.20** y **I.22** no permiten la proliferación celular superior al 50% transcurridas las 72 horas, sin embargo sí que la permiten en 48 h. Esto indica que estos compuestos con hidroxilos en el anillo A y metoxilos en el anillo B aumentan su citotoxicidad a las 72 horas respecto a las 48 horas, lo que indica que su acción biológica se potencia con el tiempo de acción. El compuesto **I.25**, el cual presenta un grupo amino en el anillo B, presenta el mismo modo de acción, con lo que se prevé una mayor acción biológica a las 72 horas respecto a las 48 horas.

4.2.3. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF

Para determinar la cantidad de proteína VEGF que las células segregan al medio de cultivo, se incubaron las células HT-29 junto con los compuestos, incluyendo el resveratrol, durante 72 horas a las concentraciones de trabajo comentadas

anteriormente. Transcurrido dicho tiempo, se recogió el medio de cultivo, al cual las células habían liberado la proteína VEGF, y se midió la cantidad de proteína utilizando la técnica ELISA, empleando como control positivo de referencia células tratadas con DMSO. Los resultados obtenidos en los ensayos ELISA se muestran en la figura 4.9.

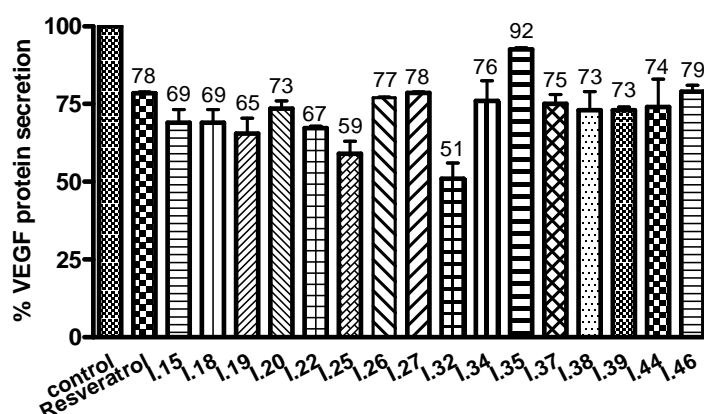


Figura 4.9. Porcentaje de secreción de la proteína VEGF en células HT-29.

De los resultados anteriores se puede concluir que el compuesto **1.32** es el que presenta una mayor potencia inhibitoria, siendo capaz de inhibir al 49% la secreción de proteína VEGF. El segundo compuesto en actividad inhibitoria es el **1.25**, que inhibe al 41% la secreción de la proteína VEGF. Ambos compuestos muestran una inhibición ligeramente superior a la del resveratrol, que es del 22%.

Para el compuesto **1.45**, se procedió del mismo modo, pero los ensayos se realizaron tanto sobre células HT-29 como MCF-7 a diferentes concentraciones durante 72 horas de incubación, comparando los resultados obtenidos con una muestra de células tratadas con DMSO. Los resultados obtenidos, incluyendo los del resveratrol ensayado a 10 µg/mL, se representan en la figura 4.10.

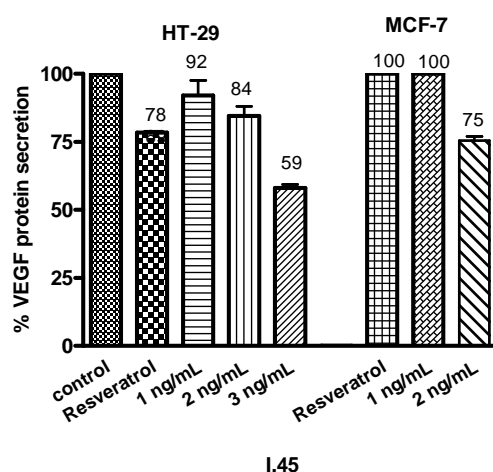


Figura 4.10. Porcentaje de secreción de la proteína VEGF en presencia del compuesto **I.45**.

El compuesto **I.45** potencia su acción al incrementar la concentración de trabajo en ambas líneas celulares. Así, en la línea HT-29 es capaz de inhibir al 41% la secreción de proteína VEGF con 3 ng/mL, mientras que en la línea MCF-7 es capaz de inhibir al 25% dicha secreción de proteína con una concentración de 2 ng/mL. De este modo, el compuesto **I.45** presenta una inhibición superior a la mostrada por el resveratrol en ambas líneas celulares, el cual fue ensayado a una concentración 3.000-5.000 veces superior.

4.2.4. Inhibición de la expresión génica de *VEGF*

Para determinar el grado de expresión del gen *VEGF* en las células tumorales HT-29 se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

La qPCR o PCR cuantitativa en tiempo real es una variación de la PCR convencional en la que en cada ciclo de amplificación se cuantifica la cantidad de ADN presente en una muestra. Se trata de una técnica altamente sensible y específica que en los últimos años se ha convertido en un método ampliamente usado para cuantificar la expresión génica. Esta técnica permite recoger la cantidad de ADN presente en cada ciclo, combinando la amplificación y la detección en un solo paso. La técnica requiere el uso de fluorocromos o sondas capaces de producir fluorescencia, la cual es medida mediante un termociclador. En nuestros laboratorios se utilizaron sondas TaqMan, formadas por oligonucleótidos lineales, marcados con un fluorocromo donador o *reporter* en la región 5' y un aceptor o *quencher* en el extremo 3'. Cuando los

extremos 5' y 3' se encuentran cerca en el espacio, la fluorescencia que emite el donador al ser excitado es absorbida por el aceptor, de modo que ninguna fluorescencia es detectada. Durante la amplificación/extensión del ADN, la sonda se une a la cadena de cADN. La polimerasa se va desplazando por la cadena de cADN e hidroliza el extremo 5' de la sonda, produciendo la señal fluorescente del fluorocromo donador al romperse la unión *reporter-quencher*. Esta señal fluorescente es medida y cuantificada, de modo que cuanto mayor sea la fluorescencia es indicativo de que hay más sondas hidrolizadas, y por tanto más cantidad de ADN amplificado. En la figura 4.11 puede verse un esquema de la reacción.

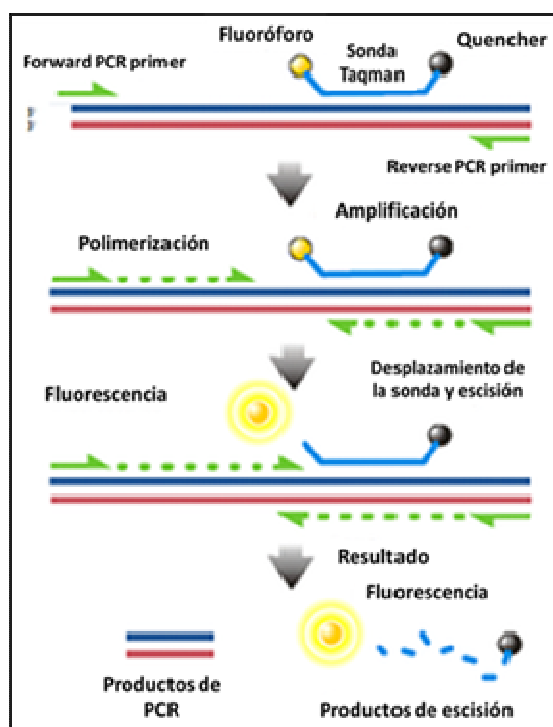


Figura 4.11. Representación del funcionamiento de las sondas TaqMan.

En esta técnica la cuantificación de ADN se realiza mediante el número de ciclos requeridos para que se inicie la fase de crecimiento exponencial. Cuanto más gen haya inicialmente en la reacción, menor será el número de ciclos requeridos.³⁸³ Este

³⁸³ Larionov, A.; Krause, A.; Miller, W. *BMC Bioinformatics* **2005**, 6, 62-78.

número de ciclos recibe el nombre de C_T y es inversamente proporcional a la cantidad de producto amplificado.³⁸⁴

La cuantificación de la cantidad de ADN amplificado se puede realizar de manera absoluta o relativa, siendo la variante relativa la utilizada en nuestro caso. Para realizar los cálculos de manera relativa se utiliza un control de referencia y todas las muestras son calculadas respecto a ese control. También se debe utilizar un gen de referencia o endógeno que se mantenga constante en todas las células, a fin de eliminar las diferencias en la cantidad de células presentes en cada muestra objeto de estudio. En nuestro caso se utilizaron células tratadas con DMSO como control de referencia y el gen β -actina como control endógeno.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de hacer los cálculos es la eficiencia de los *primers* o cebadores que se están utilizando. Teóricamente, en cada ciclo se duplican el número de copias de ADN, sin embargo en la realidad no sucede siempre así ya que en algunos casos se generan menos copias de lo esperado, lo que se conoce como eficiencia.³⁸⁵ Para determinar la eficiencia de un gen se realiza una curva de calibración con diluciones seriadas de una concentración de ADN. A continuación, se representa el logaritmo de la concentración frente al valor de C_T obtenido, de modo que la cantidad de ADN viene determinada por la siguiente ecuación:

$$\log \text{ADN} = a \cdot C_T + b$$

donde a es la pendiente de la curva y b la ordenada en el origen. La eficiencia se calcula a partir de la pendiente de la curva según:

$$E = (10^{(-1/a)} - 1) \cdot 100$$

Para cuantificar la cantidad de ADN de manera relativa hay que tener en cuenta si las eficiencias de los *primers* de todos los genes ensayados son las mismas o si difieren. Cuando las eficiencias del gen objeto de estudio y del gen endógeno son las mismas se utiliza el método de $\Delta\Delta C_T$. Con este método se comparan los C_T del gen objeto de estudio y del gen endógeno (β -actina) en cada muestra (ΔC_T) y se comparan con los ΔC_T calculados para la muestra control de referencia.³⁸⁶ El resultado se

³⁸⁴ Kubista, M.; Andrade, J.M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonak, J.; Lind, K. *Mol. Aspects Med.* **2006**, *27*, 95-125

³⁸⁵ Bustin, S.A.; Nolan, T. *J Biomol Tech* **2004**, *15*, 155-166

³⁸⁶ (a) Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W. Shipley, G. L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C. T., MIQE guideless for QPCR. *Clinical Chem.* **2009**, 611-622.(b) Willems, E.; Leyns L, Vandesompele J., *Anal. Biochem.*, **2008**, *379*, 127-129

expresa como índice RQ. El valor RQ es indicativo del número de veces que se expresa el gen objeto de estudio cuando las células son tratadas respecto al número de veces que se expresa cuando las células no son tratadas. Matemáticamente se calcula como:

$$\Delta C_T = C_{T, \text{gen estudiado}} - C_{T, \text{gen endógeno}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T, \text{muestra}} - \Delta C_{T, \text{muestra control}}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Sin embargo, cuando las eficiencias del gen objeto de estudio y del gen endógeno no son las mismas, RQ se calcula de manera diferente. En este caso se utiliza la recta de calibración a partir de la cual se obtuvo el valor de la eficiencia, y a partir del C_T obtenido para cada muestra se extrapola la cantidad de ADN. Posteriormente se calcula la relación entre la cantidad de gen objeto de estudio y la de gen endógeno, y se compara la muestra tratada respecto a la no tratada. Matemáticamente se calcula como:

$$RQ = \frac{\text{muestra}_{\text{normalizada}}}{\text{muestra control}_{\text{normalizada}}} = \frac{ADN_{\text{gen estudio, muestra}} / ADN_{\text{gen endógeno, muestra}}}{ADN_{\text{gen estudio, muestra control}} / ADN_{\text{gen endógeno, muestra control}}}$$

donde la cantidad de ADN viene dada por la recta de calibrado usada para el cálculo de las eficiencias, por lo que $ADN = 10^{\frac{C_T - b}{a}}$ siendo a la pendiente y b la ordenada en el origen.

En nuestro caso, los ensayos se efectuaron incubando las células HT-29 en presencia de los compuestos objeto de estudio, incluyendo el resveratrol, durante 48 horas a las concentraciones anteriormente citadas. Transcurrido dicho tiempo se recogieron las células, se extrajo su ARN, se retrotranscribió a ADN y posteriormente se amplificó y cuantificó el gen *VEGF* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando la β -actina como gen endógeno o de referencia y los resultados se compararon con una muestra control de células tratadas con DMSO. Los resultados obtenidos de los ensayos de expresión génica de VEGF se muestran en la figura 4.12.

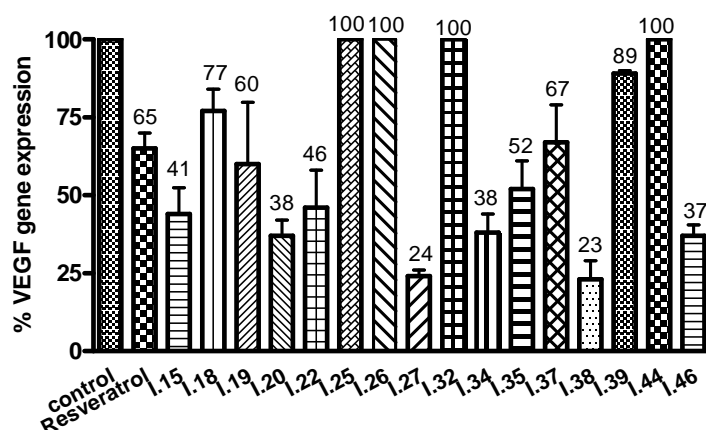


Figura 4.12. Porcentaje de expresión del gen *VEGF* en células HT-29.

Los compuestos que inhiben en un porcentaje significativo la expresión del gen *VEGF*, inhiben en mucha menor proporción la secreción de la proteína *VEGF* (compuestos **I.15**, **I.20**, **I.22**, **I.27**, **I.34**, **I.35**, **I.38** y **I.46**). Es decir, en general, este tipo de estilbenos no mostraron una correlación directa entre el grado de inhibición génica y el grado de inhibición de la secreción proteica del *VEGF*. Por ejemplo, los compuestos **I.27** y **I.38** son capaces de inhibir al 76 y 77%, respectivamente, la expresión del gen *VEGF*, pero para estos dos compuestos el porcentaje de inhibición de la secreción de la proteína *VEGF* es del 22 y del 27%, respectivamente.

Otros compuestos que muestran una relativamente alta inhibición de la expresión génica son los **I.15**, **I.20**, **I.34** y **I.46**, que la inhiben alrededor del 60%, y los compuestos **I.22** y **I.35**, que muestran una inhibición del gen *VEGF* alrededor del 50%. Sin embargo, ninguno de estos compuestos llegó a inhibir más de un 35% la secreción de la proteína, mostrando mayor capacidad de inhibición de la expresión del gen *VEGF* que de la de su proteína asociada. Esto podría tener relación con el hecho de que las células tumorales secretan las isoformas más ligeras del *VEGF*-A (*VEGF*-A₁₆₅ y *VEGF*-A₁₂₁) mientras que las isoformas más pesadas quedan retenidas en el citoplasma. Así, al provocar la inhibición de la expresión génica del *VEGF*-A, las isoformas más pesadas del *VEGF*-A, almacenadas en el citoplasma, podrían generar las isoformas más ligeras, que seguirían secretándose al medio de cultivo. Con el tiempo, esta reserva de *VEGF*-A se acabaría si no hubiese producción génica de *VEGF*. En el ensayo de inhibición de la secreción de la proteína se mide la cantidad de *VEGF*₁₆₅ y la falta de correlación entre la secreción de la proteína y la inhibición del

gen asociado podría deberse a la reserva de VEGF pesado existente en la célula, capaz de transformarse en VEGF ligero cuando la producción de VEGF está inhibida por inhibición del gen asociado.

A diferencia de lo que se acaba de describir, el compuesto **I.32** es capaz de inhibir la secreción de la proteína VEGF (49%) pero no la expresión del gen *VEGF* (0%). Esta falta de correlación entre la secreción de la proteína y la del gen asociado podría indicar que la inhibición de la proteína VEGF tiene lugar en una etapa diferente a la de la transcripción génica, tal vez en una etapa *post*-transcripcional. Es decir, el compuesto interfiere en la secreción de la proteína al exterior de la célula pero no en la producción de la misma.

En la figura 4.13 se representa la inhibición de la expresión del gen *VEGF* provocada tras tratar las células durante 48 horas con el compuesto **I.45** (a diferentes concentraciones). Se indica también la inhibición provocada por el resveratrol (a 10 $\mu\text{g/mL}$). El estudio se realizó sobre células HT-29 y MCF-7, utilizando la β -actina como gen endógeno y normalizando los resultados respecto a un control positivo de células tratadas con DMSO.

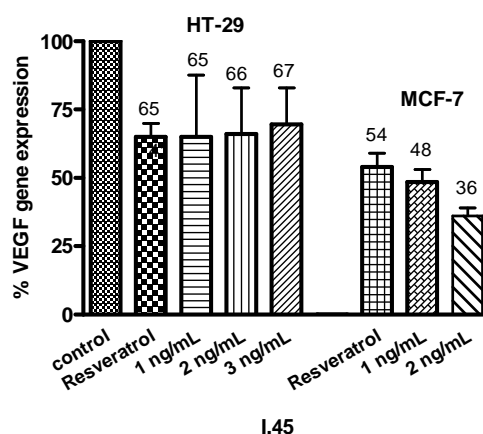


Figura 4.13. Porcentaje expresión del gen *VEGF* en presencia del compuesto **I.45**.

El compuesto **I.45** fue capaz de inhibir un 35% la expresión del gen *VEGF* en la línea celular HT-29, independientemente de la concentración empleada (siempre dentro del rango nanomolar), mientras que en la línea celular MCF-7 su capacidad inhibitoria de la expresión génica de *VEGF* está en relación directa con el aumento de la concentración de compuesto, tal y como sucedía con la secreción de la proteína

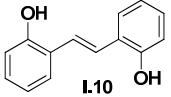
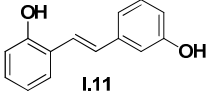
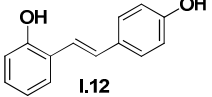
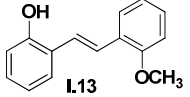
VEGF. De hecho, en la línea tumoral MCF-7, el compuesto **I.45** presentó una inhibición superior a la del resveratrol, inhibiendo tanto la secreción de la proteína VEGF como su expresión génica, en concentraciones 5.000 veces inferiores a la del aquél.

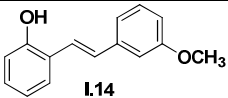
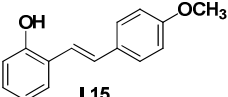
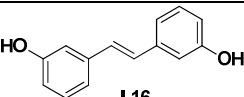
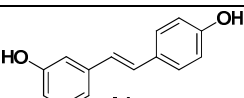
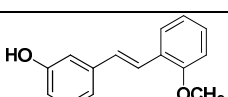
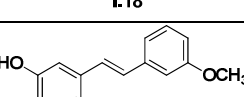
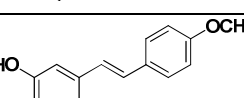
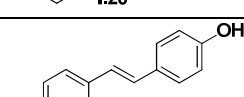
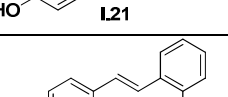
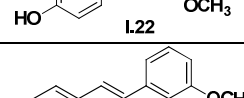
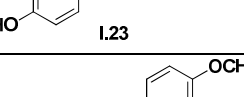
4.2.5. Ensayo de migración celular con células BAEC

La inhibición de la migración de células endoteliales es otra variable que permite evaluar la capacidad antiangiogénica de un compuesto. Para medir esta propiedad se realizó el *ensayo de la herida* sobre una monocapa de células endoteliales de aorta de bovino (BAEC). La no migración de células endoteliales es indicativa de que el compuesto estudiado es un potencial agente antiangiogénico, pues no permite que las células endoteliales migren hacia el tumor y formen la red capilar. Para este estudio se eligieron los compuestos estilbénicos hidroxilados y/o metoxilados **I.10-I.24**.

Con el fin de conocer qué compuestos y qué concentraciones eran las óptimas, se determinó en primer lugar, sobre la línea celular BAEC, el valor de IC_{50} mediante ensayo con MTT a 48 h. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 4.4. Nótese que para realizar este estudio únicamente se eligieron aquellos compuestos con mayor semejanza al resveratrol, es decir, los compuestos hidroxilados (**I.10-I.24**).

Tabla 4.4. Valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a 48 h sobre células BAEC de los compuestos **I.10-I.24**

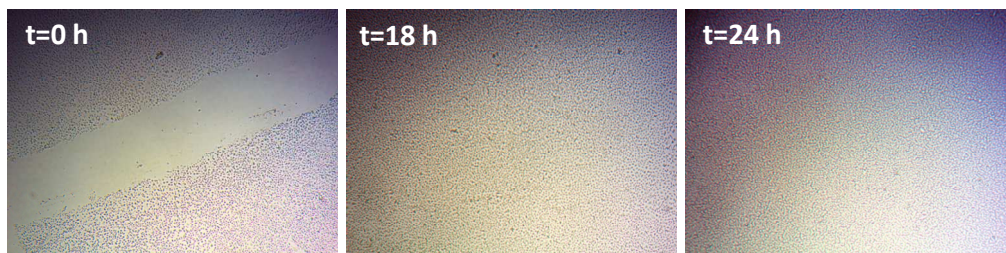
Compuesto	BAEC
Resveratrol	$11,9 \pm 1,2$
 I.10	12 ± 3
 I.11	$7,5 \pm 0,4$
 I.12	$11,2 \pm 2,3$
 I.13	$12,4 \pm 0,4$

 <p>I.14</p>	13,5 ± 2,2
 <p>I.15</p>	23 ± 12
 <p>I.16</p>	18 ± 6
 <p>I.17</p>	2,6 ± 1,5
 <p>I.18</p>	20,9 ± 1,9
 <p>I.19</p>	17,7 ± 1,1
 <p>I.20</p>	17,6 ± 1,3
 <p>I.21</p>	0,43 ± 0,22
 <p>I.22</p>	13,8 ± 1,4
 <p>I.23</p>	11,1 ± 1,9
 <p>I.24</p>	4,8 ± 1,2

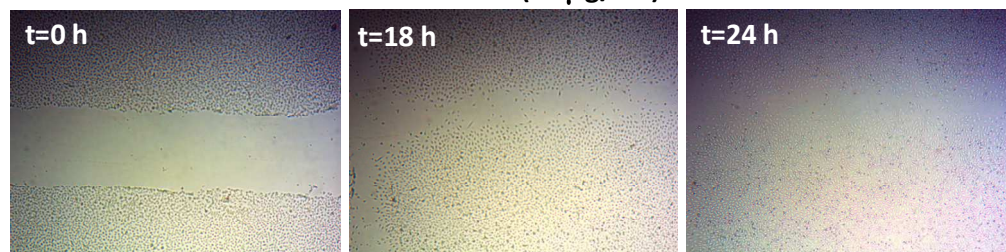
Todos los compuestos estudiados presentan una citotoxicidad media-baja en el rango micromolar frente a las células BAEC. Cabe señalar que los compuestos **I.17**, **I.21** y **I.24** presentan valores de citotoxicidad relativamente bajos (2,6, 0,43 y 4,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), mientras que los compuestos **I.15**, **I.18**, **I.19** y **I.20** presentan los valores relativamente altos (23, 20,9, 17,7 y 17,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) y por tanto, fueron los que se eligieron para llevar a cabo el *ensayo de la herida*.

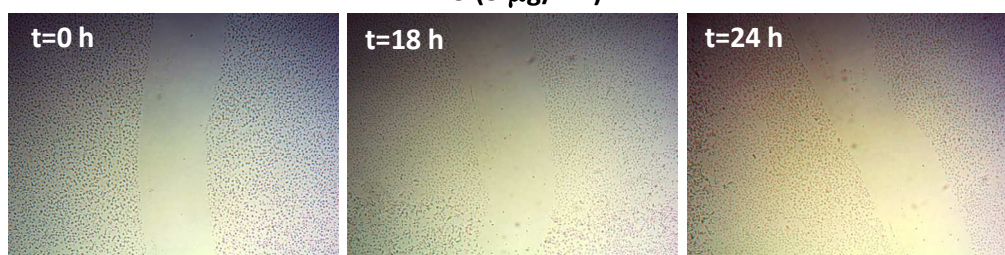
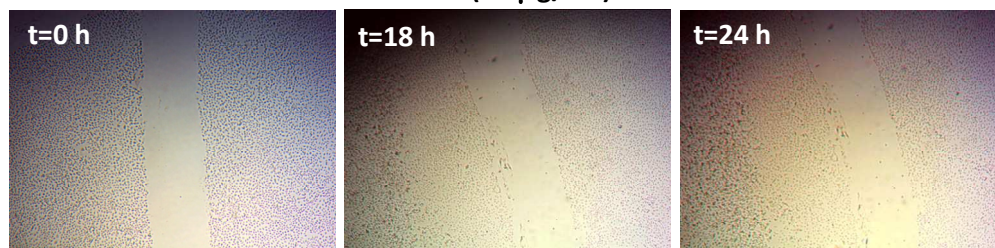
Para realizar este estudio se sembraron células en diferentes pocillos y cuando se observó que estaban confluentes se realizó una “herida” en forma de cruz con la punta de una pipeta. Se cambió el medio de cultivo con el fin de eliminar las células despegadas y se añadieron los productos objeto de estudio a diferentes concentraciones. Se tomaron fotos de las células a tiempo cero (0 h), a las 18 h y a las 24 h. Los resultados obtenidos pueden verse en las siguientes imágenes.

Control +



Resveratrol (15 $\mu\text{g/mL}$)



I.15 (5 $\mu\text{g/mL}$)**I.18 (5 $\mu\text{g/mL}$)****I.19 (5 $\mu\text{g/mL}$)****I.20 (10 $\mu\text{g/mL}$)**

El estudio de las imágenes tomadas muestra que en el control positivo (DMSO), y transcurridas 18 horas, las células endoteliales vuelven a juntarse, tapando por completo la *herida* formada. En el caso del resveratrol, a una concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$, puede verse como transcurridas 24 horas las células son capaces de bloquear parcialmente la *herida* formada, mientras que en concentraciones inferiores el efecto es nulo. Sin embargo, los compuestos **I.15**, **I.18** y **I.19** son capaces de inhibir completamente la capacidad de las células endoteliales para bloquear la *herida* formada a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, por lo que estos tres compuestos, *a priori*, serían buenos agentes antiangiogénicos.

El compuesto **I.20** no permite la reagrupación de células endoteliales a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo sí que lo permite con una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, mostrando de este modo una mayor capacidad que el resveratrol para inhibir la migración de células endoteliales.

La conclusión de este estudio es que los cuatro compuestos ensayados son capaces de inhibir la migración celular de células BAEC en concentraciones inferiores a la del resveratrol, y a la de su propio valor de IC_{50} , lo que permitiría el bloqueo de la angiogénesis a concentraciones no tóxicas para las células endoteliales.

4.2.6. Inhibición de la expresión génica de *hTERT*

Para evaluar la capacidad de inhibición del gen *hTERT*, que codifica la parte proteica de la telomerasa, se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los ensayos se efectuaron siguiendo el mismo procedimiento experimental empleado en la determinación de la expresión del gen *VEGF*. Las células HT-29 se cultivaron en presencia de los productos, incluyendo el resveratrol, a las concentraciones de trabajo durante 48 horas. Transcurrido dicho tiempo, se recogieron las células, se extrajo su ARN y éste se retrotranscribió a ADN. El ADN se amplificó usando sondas TaqMan. También en este caso se utilizó la β -*actina* como gen endógeno y los resultados se compararon respecto a una muestra control formada por células tratadas sólo con DMSO. Los resultados de la qPCR para la expresión del gen *hTERT* se muestran en la figura 4.14.

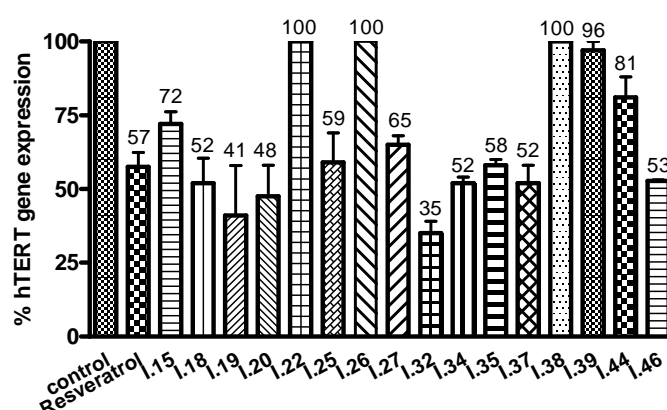


Figura 4.14. Porcentaje de expresión del gen *hTERT* en células HT-29.

El compuesto más activo es el **I.32**, que es capaz de inhibir un 65% la expresión del gen *hTERT*. Asimismo, los compuestos **I.18**, **I.19**, **I.20**, **I.34**, **I.37** y **I.46** son capaces de inhibir la expresión del gen *hTERT* alrededor del 50%, valor superior al mostrado por el resveratrol, que muestra una inhibición del 43%.

Para el compuesto **I.45** se midió la inhibición del gen *hTERT* tanto en células HT-29 como MCF-7 a diferentes concentraciones a 48 horas. Los resultados se normalizaron respecto a una muestra de células tratadas con DMSO y la β -actina se utilizó como gen endógeno. Los resultados obtenidos, incluyendo los del resveratrol ensayado a 10 μ g/mL, se presentan en la figura 4.15.

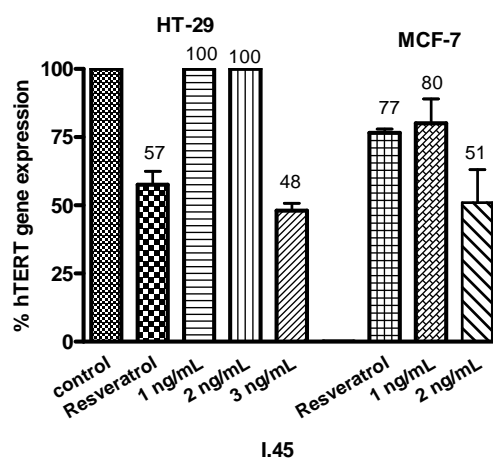


Figura 4.15. Porcentaje de expresión del gen *hTERT* en presencia del compuesto **I.45**.

Cuando se emplea una concentración de **I.45** de 3 ng/mL se logra una inhibición de la expresión del gen *hTERT* del 52% en células HT-29. Sobre células MCF-7 la inhibición es del 49% cuando se emplea una concentración de 2 ng/mL. Las inhibiciones del gen son superiores a las del resveratrol en términos absolutos pero la diferencia es mucho mayor en términos relativos si se tiene en cuenta que en la figura 4.15 la concentración utilizada para el resveratrol es de 10 µg/mL.

4.2.7. Inhibición de la expresión génica de *c-Myc*

Los resultados de inhibición de la expresión del gen *c-Myc*, medidos mediante la técnica de qPCR tras 48 horas de incubación de las células con los compuestos a las concentraciones de trabajo anteriormente citadas, incluyendo el resveratrol, se muestran en la figura 4.16. Los ensayos se efectuaron siguiendo el mismo procedimiento experimental empleado en el caso de los genes *VEGF* y *hTERT* (células tratadas con DMSO como referencia y β -actina como gen endógeno).

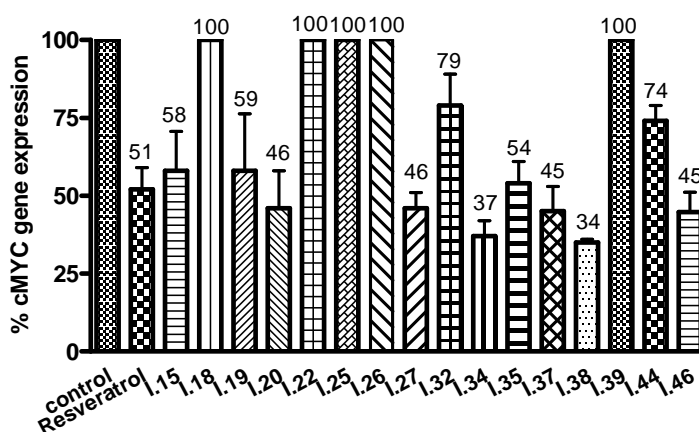


Figura 4.16. Porcentaje de expresión del gen *c-Myc* en células HT-29.

Los compuestos más activos son **I.34** y **I.38** que muestran una inhibición del gen *c-Myc* de alrededor del 65%. Los compuestos **I.20**, **I.27**, **I.37** y **I.46** también son capaces de inhibir este gen, pero con porcentajes de alrededor del 50%. Estos seis compuestos inhiben la expresión del gen *c-Myc* en un porcentaje superior al mostrado por el resveratrol, que es del 49%.

Para el compuesto **I.45** se midió la inhibición del gen *c-Myc* tanto en células HT-29 como MCF-7 a diferentes concentraciones tras 48 horas de incubación, comparando los resultados con una muestra de células tratadas con DMSO y utilizando la β -actina como gen endógeno. Los resultados obtenidos, incluyendo los del resveratrol ensayado a 10 μ g/mL, se muestran en la figura 4.17.

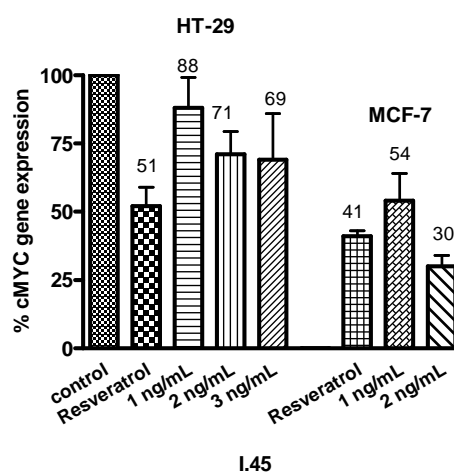


Figura 4.17. Porcentaje de expresión del gen *c-Myc* en presencia del compuesto **I.45**.

El compuesto **I.45** presenta una actividad inhibitoria del gen *c-Myc* superior a la del resveratrol en células MCF-7, ya que inhibe al 70% la expresión génica con una concentración de 2 ng/mL. En la línea HT-29 su capacidad inhibitoria es mucho menor. Así, con 3 ng/mL sólo inhibe el 31% la expresión del gen *c-Myc*.

En la figura 4.18 se representan los porcentajes de expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*. Todos los compuestos que se encuentren a la izquierda de la línea vertical discontinua podrían ser buenos agentes inhibidores de *hTERT* y, por tanto, potenciales agentes antitelomerasa, puesto que son capaces de inhibir el gen responsable de su activación. Por otro lado, los compuestos capaces de inhibir el protooncogen *c-Myc* aparecen por debajo de la línea horizontal discontinua y, aunque no inhiban el gen *hTERT*, pueden ser buenos agentes anticáncer, ya que el gen *c-Myc* es uno de los más importantes protooncogenes, encargado de codificar una serie de proteínas nucleares que controlan la transcripción de algunos oncogenes.

En el cuadrante inferior-izquierdo de la figura 4.18 se encuentran ubicados los compuestos **I.20**, **I.34**, **I.37** y **I.46** y son los que exhiben una baja expresión de ambos genes. Además, para estos compuestos se observa la existencia de una correlación entre el porcentaje de inhibición de los genes *hTERT* y *c-Myc*. Esta correlación podría deberse a que estos compuestos son capaces de disminuir la expresión del gen *hTERT* porque interfieren en la expresión del gen *c-Myc*, ya que éste codifica un factor de transcripción que controla la expresión de *hTERT*. Es decir, esta correlación permitiría establecer que, estos compuestos, consiguen controlar la producción génica de *hTERT* a través del control de la producción del factor de transcripción *c-Myc*.

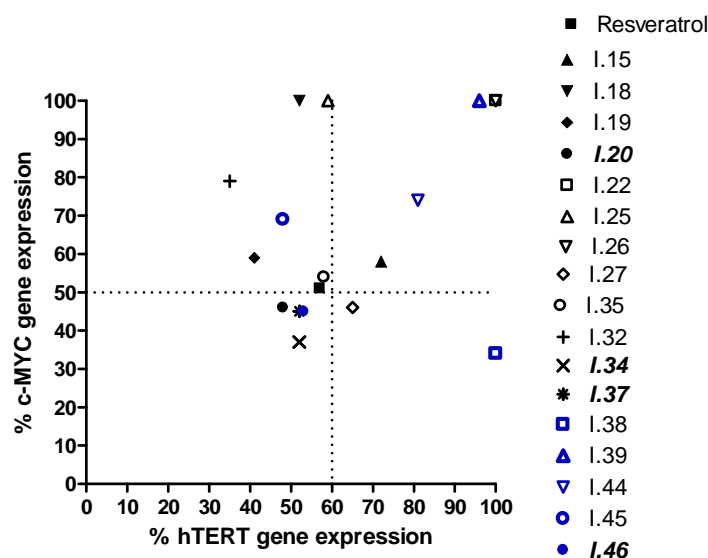


Figura 4.18. Valores de expresión del gen *c-Myc* frente al gen *hTERT*.

4.2.8. Conclusiones

En primer lugar cabe resaltar que los compuestos con grupo amino como sustituyente presentan, por lo general, una actividad mucho mayor a la mostrada por los compuestos con sustituyente hidroxilo, independientemente de que en el otro anillo haya sustitución de hidroxilo o metoxilo e independientemente de su posición.

El compuesto más activo de todos los estudiados es el **I.45** ((*E*)-4-(4-metoxiestiril)-anilina) ya que exhibe su actividad biológica a nivel nanomolar. A partir de los resultados obtenidos para el compuesto **I.45** en las dos líneas tumorales ensayadas puede concluirse que el compuesto es mucho más activo en la línea celular MCF-7

que en la línea HT-29, presentando una inhibición igual o superior al 50% en todos los genes ensayados y a una concentración en el rango nanomolar. Todo esto hace que el compuesto **I.45** sea interesante no solo desde el punto de vista citotóxico, sino también desde el punto de vista anti-VEGF y antitelomerasa.

En la figura 4.19 se representan los porcentajes de expresión del gen *VEGF* y de expresión del gen *hTERT*. Cuando se combinan estas dos propiedades, los compuestos que se ubican en el cuadrante inferior izquierda, y que por tanto presentan mayores inhibiciones génicas, son **I.20**, **I.34** y **I.46**.

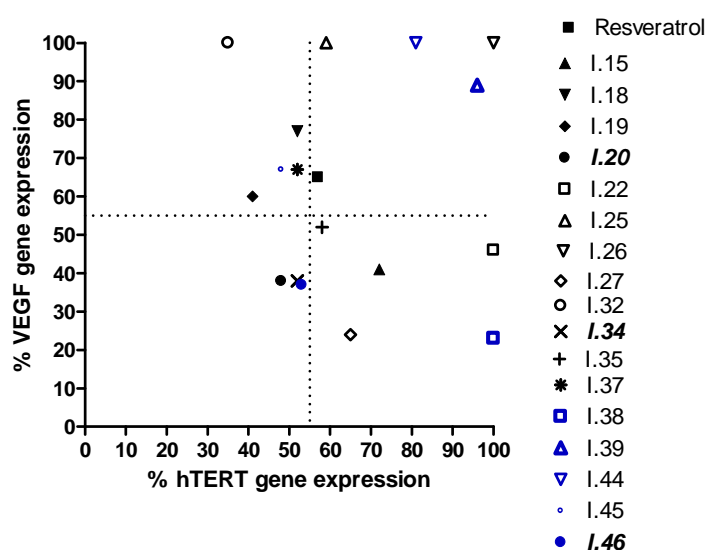


Figura 4.19. Valores de expresión del gen *VEGF* frente al gen *hTERT*.

En la figura 4.20 se representan los porcentajes de secreción de la proteína VEGF y de expresión del gen *hTERT*. Cuando se combinan estas dos propiedades, el compuesto que se ubica en el cuadrante inferior izquierda, y que por tanto presenta una actividad dual, es el **I.32**.

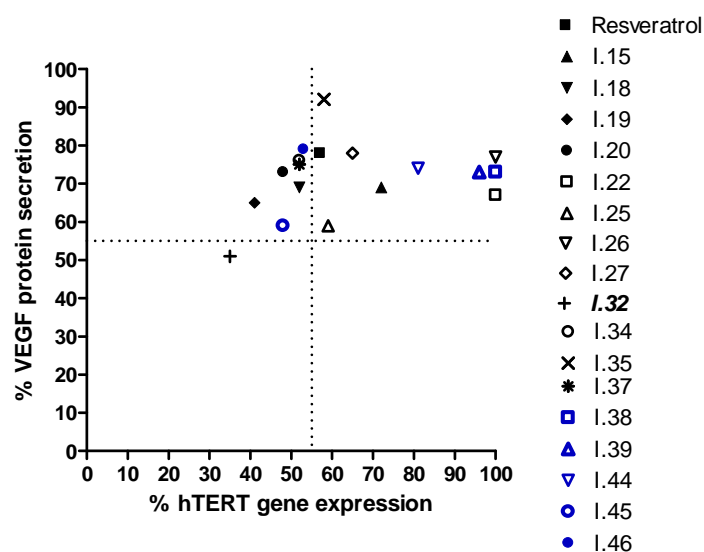
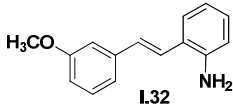
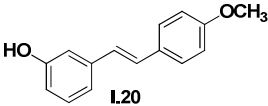
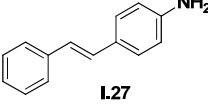
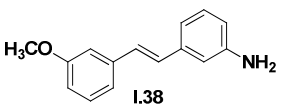
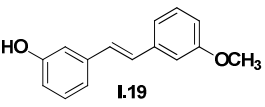
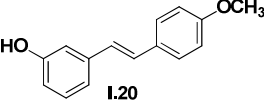
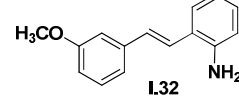
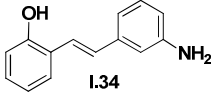
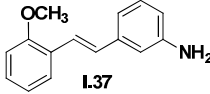
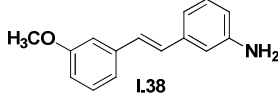
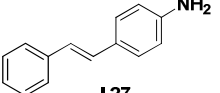
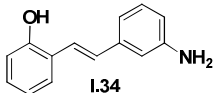
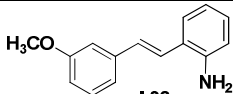


Figura 4.20. Valores de secreción de la proteína VEGF frente a la expresión del gen *hTERT*.

En la tabla 4.5, en la que no figura el compuesto **I.45**, se reúnen los compuestos más activos (inhibiciones superiores al 50%) para cada diana biológica. En caso de igualdad en alguna diana, se ha elegido como compuesto más activo el más citotóxico sobre células HT-29. En la tabla 4.5 tampoco se han incluido las amidas, aunque en alguna diana biológica, como en la expresión del gen *VEGF* y del gen *c-Myc* el compuesto **I.46** muestra relativamente altas capacidades inhibitorias. La no inclusión de las amidas se ha hecho con el fin de facilitar la extracción de conclusiones en la relación estructura-actividad.

Tabla 4.5. Compuestos más activos (no se incluye el compuesto **I.45** ni la amida **I.46**)

Diana biológica	Compuestos con mayor actividad
Secreción de VEGF	 I.32
Inhibic. gen VEGF	   I.20 I.27 I.38
Inhibic. gen hTERT	   I.19 I.20 I.32
Inhibic. gen c-Myc	   I.34 I.37 I.38
Inhibic. gen VEGF+ gen hTERT	  I.27 I.34
Inhibic. prot. VEGF+ gen hTERT	 I.32

Las conclusiones que se pueden extraer del párrafo anterior y de la tabla 4.5 son las siguientes:

1) El compuesto más activo es la estirilnilina **I.45**. El hecho de que este compuesto actúe en el rango nanomolar, mientras que el resto de compuestos lo haga en el rango micromolar, puede indicar que su mecanismo de actuación es diferente.

2) De entre las estirilnilinas, las más activas son las (metoxiestiril)anilinas, siendo la **I.45**, con la posición relativa de los grupo amino y metoxi en *para-para*, la que otorga al compuesto la capacidad de inhibición a nivel nanomolar.

Además, la familia de derivados de tipo estirilnilina es la que aporta más representantes en la tabla 4.5 (**I.27**, **I.32**, **I.34**, **I.37** y **I.38**).

3) De entre las estirilánilinas, y aparte del compuesto **I.45**, la más activa es la **I.34** ((*E*)-3-(2-hidroxiestiril)anilina), ya que presenta una actividad dual, modulando la expresión del gen *VEGF* y la inhibición de los genes *hTERT* y *c-Myc*. Le siguen los compuestos **I.32** ((*E*)-2-(3-metoxiestiril)anilina) y **I.38** ((*E*)-3-(3-metoxiestiril)anilina).

4) La familia de los (metoxiestiril)fenoles aporta dos representantes a la tabla 4.5, los compuestos **I.19** ((*E*)-3-(3-metoxiestiril)fenol) y **I.20** ((*E*)-3-(4-metoxiestiril)fenol). No hay representantes del tipo (hidroxiestiril)fenol, por lo que se puede concluir que es necesaria la metilación del hidroxilo fenólico para alcanzar buenos niveles de actividad en las dianas biológicas estudiadas.

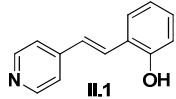
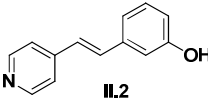
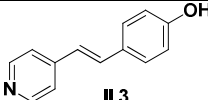
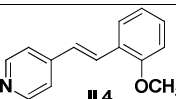
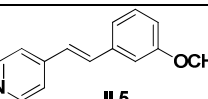
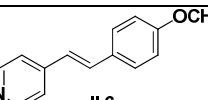
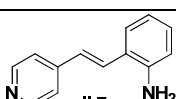
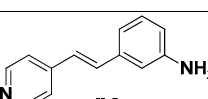
En síntesis, la actividad dual se obtiene cuando se combinan correctamente las posiciones y los sustituyentes, sin existir un patrón claramente identificable.

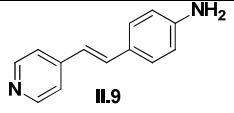
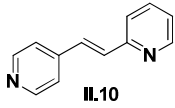
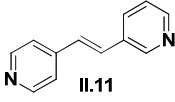
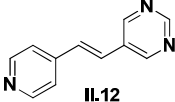
4.3. Evaluación biológica de estirilpiridinas y estirilpirimidinas

4.3.1. Citotoxicidad

En la tabla 4.6 se reúnen los valores de IC_{50} del resveratrol, de las estirilpiridinas **II.1-II.11** y de la azaestirilpirimidina **II.12**, medidos en las líneas celulares HT-29, MCF-7 y HEK-293 después de 48 horas de incubación mediante ensayo con MTT. También se indican los coeficientes α y β .

Tabla 4.6. Valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a 48 h y coeficientes α y β de los compuestos **II.1-II.12**

Compuesto	HT-29	MCF-7	HEK-293	α	β
Resveratrol	$34,1 \pm 1,4$	$16,1 \pm 1,1$	$7,1 \pm 1,0$	0,21	0,44
 II.1	>100	>100	$47,9 \pm 1,2$	<0,48	<0,48
 II.2	61 ± 8	$14,0 \pm 1,1$	$8,9 \pm 0,8$	0,15	0,64
 II.3	33 ± 4	$3,157 \pm 0,018$	$2,5 \pm 0,4$	0,08	0,79
 II.4	16 ± 3	21 ± 4	18 ± 3	1,13	0,86
 II.5	$9,2 \pm 0,9$	$18,6 \pm 2,3$	$11,8 \pm 1,6$	1,28	0,63
 II.6	$12,8 \pm 0,5$	30 ± 3	24 ± 5	1,88	0,80
 II.7	50 ± 4	75 ± 20	$2,5 \pm 1,8$	0,05	0,03
 II.8	33 ± 4	46 ± 3	>100	>3,03	>2,17

 II.9	19,6 ± 2,1	4,04 ± 0,05	8 ± 3	0,41	1,98
 II.10	44 ± 7	>100	84 ± 12	1,91	<0,84
 II.11	16 ± 4	24 ± 7	26 ± 13	1,63	1,08
 II.12	20 ± 6	>100	>100	>5	--

La mayoría de los compuestos presentan actividad citotóxica en el rango micromolar medio-bajo. El compuesto más activo en la línea tumoral HT-29 es el **II.5**, seguido de los compuestos **II.4**, **II.6** y **II.11**, con valores de IC_{50} de 9,2, 16, 12,8 y 16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En la línea tumoral MCF-7 cabe destacar a los compuestos **II.2**, **II.3** y **II.9**, con valores de IC_{50} 14, 3,16 y 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

En la figura 4.21 se representan los valores de β frente a α de los compuestos de la tabla 4.6. Los compuestos **II.8** y **II.11**, situados en el cuadrante superior derecha, combinan un buen margen de seguridad terapéutica en las dos líneas tumorales, ya que presentan valores de α y β superiores a la unidad simultáneamente.

Los compuestos **II.4**, **II.5**, **II.6**, **II.10** y **II.12** son capaces de inhibir selectivamente a las células HT-29 frente a las células no tumorales HEK-293 (coeficientes α de 1,13, 1,28, 1,88, 1,91 y 5, respectivamente), mientras que el compuesto **II.9** es capaz de inhibir selectivamente la proliferación de células tumorales MCF-7 frente a las no tumorales HEK-293 (coeficiente β de 1,98).

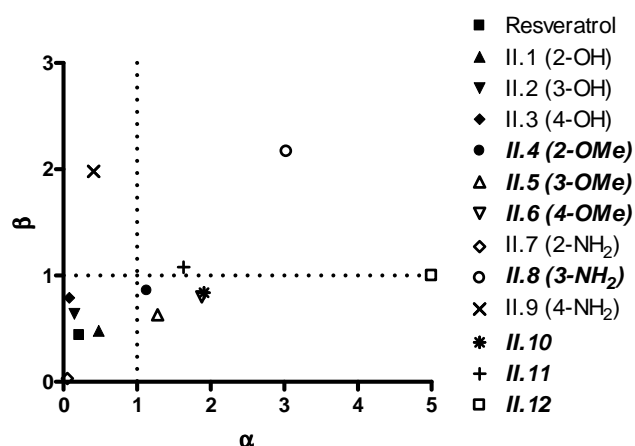
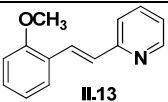
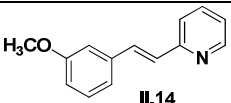
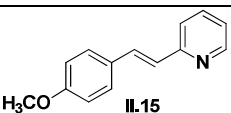


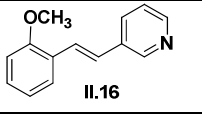
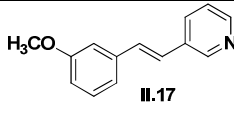
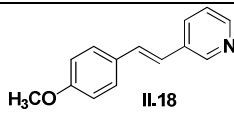
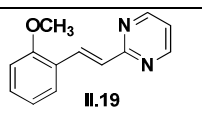
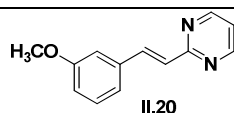
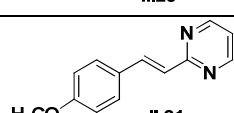
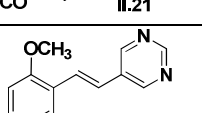
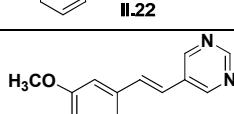
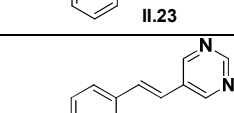
Figura 4.21. Representación de coeficientes β frente α para los compuestos II.1-II.12.

De la figura 4.21 se puede deducir que las (hidroxiestiril)piridinas **II.1-II.3** no presentan selectividad citotóxica en ninguna de las líneas tumorales ensayadas.

En la tabla 4.7 se reúnen los valores de IC_{50} del resveratrol, de las (metoxiestiril)piridinas **II.13-II.18** y de las (metoxiestiril)pirimidinas **II.19-II.24**, medidos en las líneas celulares HT-29, MCF-7 y HEK-293, después de 48 horas de incubación con ensayo MTT. También se indican los coeficientes α y β .

Tabla 4.7. Valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a 48 h y coeficientes α y β de los compuestos **II.13-II.24**

Compuesto	HT-29	MCF-7	HEK-293	α	β
Resveratrol	34,1 \pm 1,4	16,1 \pm 1,1	7,1 \pm 1,0	0,21	0,44
 II.13	58 \pm 3	0,36 \pm 0,14	37 \pm 6	0,64	102,78
 II.14	47 \pm 5	43 \pm 7	14,3 \pm 2,1	0,30	0,33
 II.15	24,1 \pm 0,7	31 \pm 10	42 \pm 7	1,74	1,35

 II.16	30 ± 4	40 ± 3	22,6 ± 0,6	0,75	0,57
 II.17	22 ± 5	27 ± 4	26 ± 6	1,18	0,96
 II.18	63 ± 8	13,1 ± 0,7	45 ± 6	0,71	3,44
 II.19	>100	>100	58 ± 10	<0,58	<0,58
 II.20	36 ± 12	9,34 ± 0,21	24 ± 5	0,67	2,57
 II.21	57 ± 8	58 ± 11	25 ± 8	0,44	0,43
 II.22	31 ± 4	>100	34 ± 6	1,10	<0,34
 II.23	64 ± 11	>100	42 ± 7	0,66	<0,42
 II.24	>100	>100	55 ± 3	<0,55	<0,55

Los compuestos de la tabla 4.7 presentan valores de IC₅₀ en el rango micromolar. En la línea tumoral HT-29 todos los compuestos presentan valores medios de citotoxicidad, resaltando los compuestos **II.15** y **II.17** que exhiben valores de IC₅₀ inferiores a los del resveratrol (24,1 y 22 µg/mL, respectivamente, frente a 34,1 µg/mL). En la línea tumoral MCF-7 cabe destacar a los compuestos **II.13**, **II.18** y **II.20**, con valores de IC₅₀ 0,36, 13,1 y 9,34 µg/mL, respectivamente.

En la figura 4.22 se representan los valores de β frente a α de los compuestos de la tabla 4.7. El compuesto **II.15** exhibe valores relativamente altos de ambos

coeficientes (α 1,74 y β 1,35). Los compuestos **II.17** y **II.22** presentan valores de α mayores a la unidad (1,18 y 1,10, respectivamente), pero valores del coeficiente β por debajo de esta cifra (0,96 y 0,34, respectivamente).

El compuesto **II.13** exhibe un excelente índice terapéutico en la línea tumoral MCF-7 (elevado valor de β). En este sentido también cabe destacar a los compuestos **II.18** y **II.20** (véase la figura 4.22).

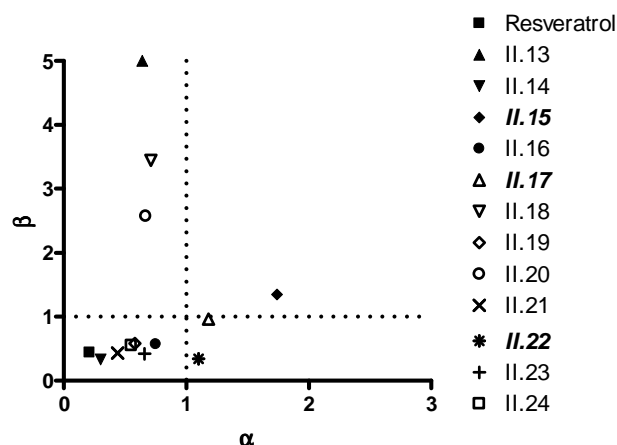


Figura 4.22. Representación de coeficientes β frente α para los compuestos **II.13-II.24**. En el compuesto **II.13** se ha utilizado un valor de 5 para la representación de β para facilitar la visualización de la gráfica.

Para la evaluación de las siguientes actividades biológicas se eligieron los compuestos **II.4**, **II.5**, **II.6**, **II.8**, **II.10**, **II.11**, **II.12**, **II.15**, **II.17** y **II.22**, que presentan un coeficiente de selectividad α superior a la unidad, ya que los ensayos de medición de la secreción de VEGF y de inhibición génica de *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc* se iban a llevar a cabo sobre la línea celular tumoral HT-29. También se eligió el compuesto **II.9** porque exhibe un IC_{50} no muy alto, e inferior al mostrado por el resveratrol en la línea tumoral HT-29 y presenta un buen índice β .

4.3.2. Estudio de la inhibición de la proliferación celular

Los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo empleando en todos los casos concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$, excepto para el producto **II.5**, para el cual, y dada su mayor citotoxicidad en la línea celular HT-29, se emplearon concentraciones de 5

$\mu\text{g/mL}$. Para comprobar que las concentraciones de trabajo estaban elegidas correctamente, se determinó la proliferación celular de las células HT-29. Para ello se incubaron los compuestos durante 48 y 72 horas y, transcurrido este tiempo se contó el número de células vivas que había en cada uno de los pocillos utilizando una cámara de Neubauer y azul de tripano como colorante. Los resultados obtenidos, normalizados respecto a una muestra de células tratadas únicamente con DMSO, muestran que las concentraciones elegidas para realizar los ensayos son correctas, pues en todos los casos hay más de un 50% de células vivas (véase la figura 4.23).

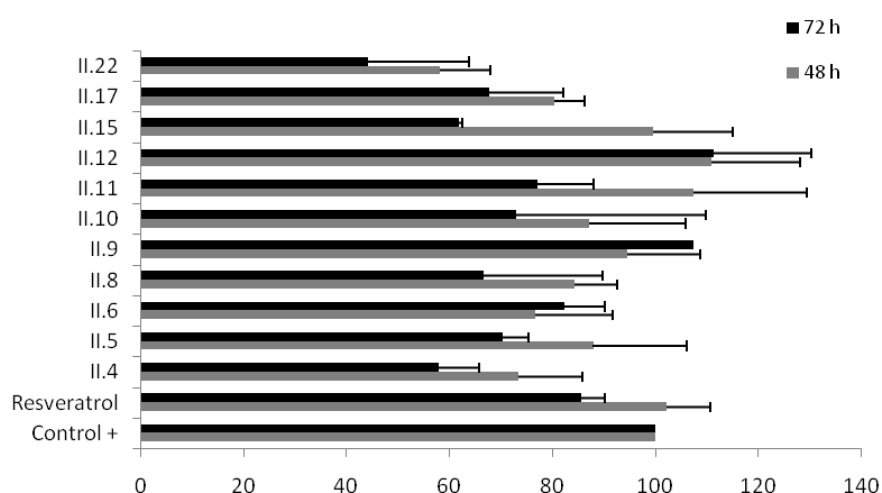


Figura 4.23. Proliferación celular sobre células HT-29.

4.3.3. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF en células HT-29

La cantidad de proteína VEGF secretada al medio de cultivo celular se midió mediante ensayo ELISA a 72 horas utilizando los compuestos elegidos, incluyendo al resveratrol, con las concentraciones de trabajo anteriormente comentadas y comparando los resultados con una muestra de células tratadas con DMSO. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.24.

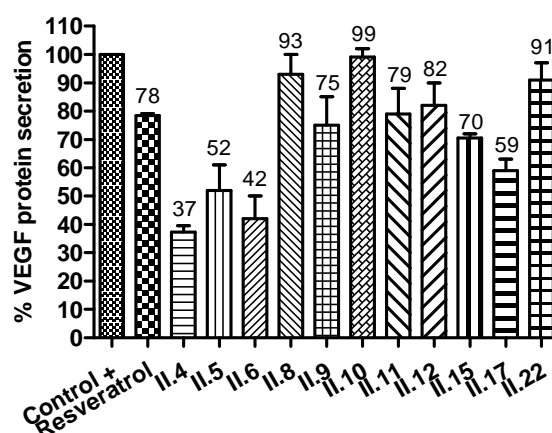


Figura 4.24. Porcentaje de secreción de la proteína VEGF en células HT-29.

Los resultados de la figura 4.24 ponen de manifiesto que los compuestos **II.4** y **II.6** son capaces de inhibir un 63 y un 58%, respectivamente, la secreción de la proteína VEGF. El compuesto **II.5** inhibe un 48% la secreción de VEGF, valor que resulta mayor al del resveratrol (22% de inhibición de la secreción).

4.3.4. Inhibición de la expresión génica de *VEGF* en células HT-29

La inhibición del gen *VEGF* se midió mediante la técnica qPCR tras tratar las células con los compuestos seleccionados, incluyendo el resveratrol, a las concentraciones anteriormente descritas durante 48 horas, utilizando la *β -actina* como control endógeno y normalizando los resultados con una muestra de células tratadas con DMSO. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.25.

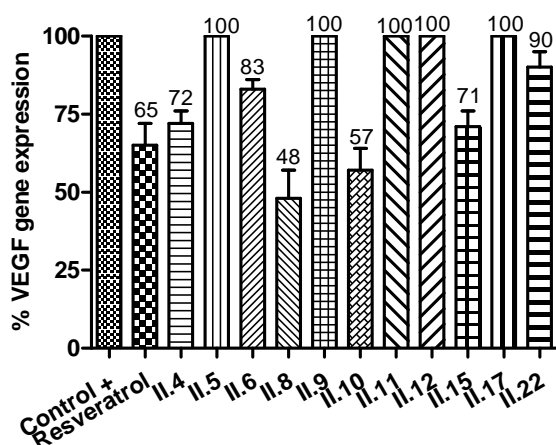


Figura 4.25. Porcentaje de expresión del gen *VEGF* en células HT-29.

El único compuesto capaz de inhibir significativamente la expresión del gen *VEGF* es el **II.8**, que logra un 52% de inhibición, valor superior al mostrado por el resveratrol (35% de inhibición). El compuesto **II.10** también presenta una inhibición ligeramente superior a la mostrada por el resveratrol, siendo capaz de inhibir un 43% la inhibición del gen *VEGF*.

4.3.5. Inhibición de la expresión génica de *hTERT* en células HT-29

La inhibición del gen *hTERT*, tras tratar las células con los compuestos seleccionados a las concentraciones anteriormente descritas durante 48 horas, incluyendo al resveratrol, se midió mediante la técnica qPCR usando la β -actina como control endógeno y referenciando los resultados con una muestra de células tratadas con DMSO. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.26.

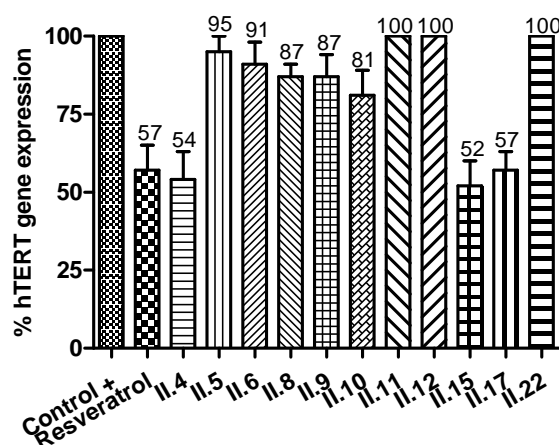


Figura 4.26. Porcentaje de expresión del gen *hTERT* en células HT-29.

Los compuestos **II.4** y **II.15** inhiben la expresión del gen *hTERT* el 46 y el 48%, respectivamente, valores ligeramente superiores a los conseguidos por el resveratrol (43% de inhibición).

4.3.6. Inhibición de la expresión génica de *c-Myc* en células HT-29

La inhibición del gen *c-Myc*, tras tratar las células con los compuestos seleccionados a las concentraciones anteriormente descritas durante 48 horas, incluyendo al resveratrol, se midió mediante la técnica qPCR, usando la β -actina como control endógeno y referenciando los resultados con una muestra de células tratadas con DMSO. Los porcentajes de expresión del gen se muestran en la figura 4.27.

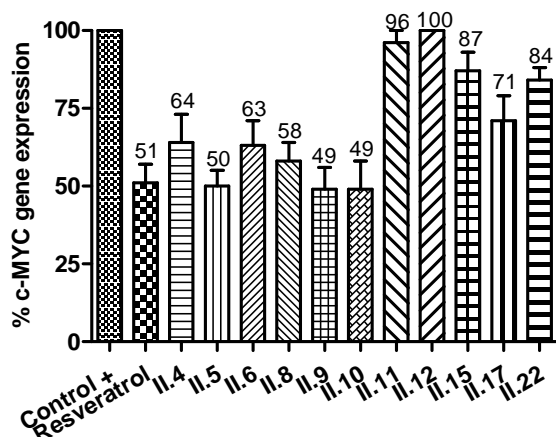


Figura 4.27. Porcentaje de expresión del gen *c-Myc* en células HT-29.

Los compuestos más activos fueron el **II.5**, **II.9** y el **II.10**, que inhibieron la expresión del gen *c-Myc* alrededor del 50%, valor muy similar a la inhibición conseguida con el resveratrol, que es del 49%.

4.3.7. Conclusiones

En la figura 4.28 se representan los valores de secreción de la proteína VEGF frente a inhibición del gen *hTERT*. Los compuestos más activos frente a estas dos dianas biológicas se hallan situados en el cuadrante inferior izquierda y son el **II.4** y el **II.17**.

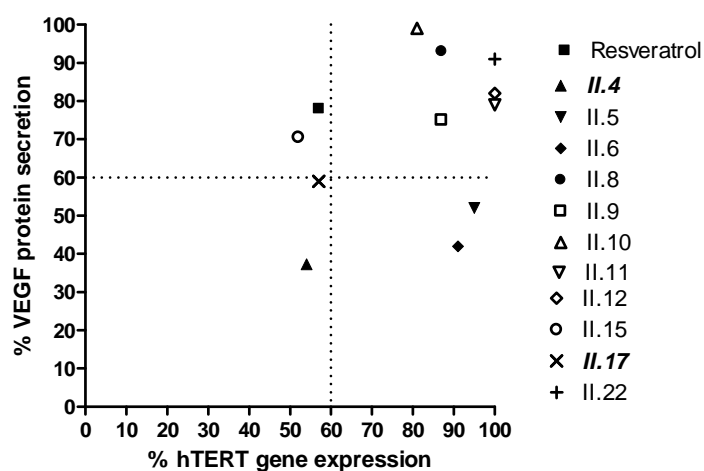


Figura 4.28. Valores de secreción de la proteína VEGF frente a la expresión del gen *hTERT*.

En la figura 4.29 se representan los valores de secreción de la proteína VEGF frente a inhibición del gen *c-Myc*. El compuesto más activo frente a estas dos dianas biológicas se halla situado en el cuadrante inferior izquierda y es el **II.5**.

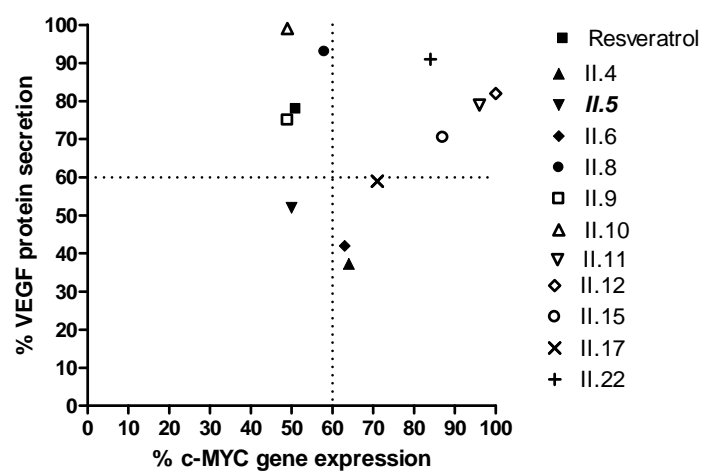
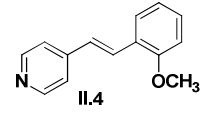
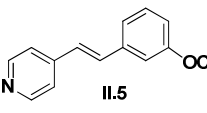
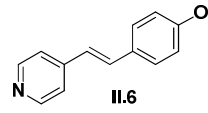
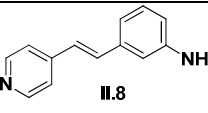
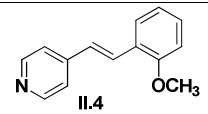
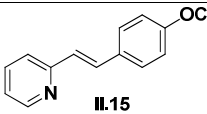
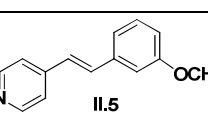
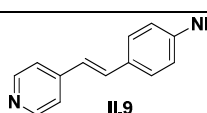
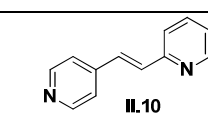
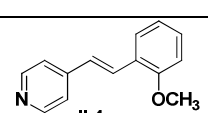
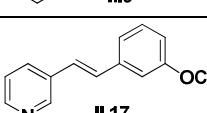
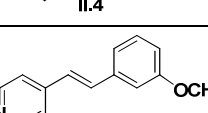


Figura 4.29. Valores de secreción de proteína VEGF frente a la expresión del gen *c-Myc*.

En la tabla 4.8 se reúnen los compuestos más activos frente a las diferentes dianas biológicas.

Tabla 4.8. Compuestos más activos

Diana biológica	Compuestos con mayor actividad
Secreción de VEGF	  
Inhibic. gen VEGF	
Inhibic. gen hTERT	 
Inhibic. gen c-Myc	  
Inhibic. prot. VEGF + gen hTERT	 
Inhibic. prot. VEGF + gen c-Myc	

De la tabla anterior se concluye que:

1) La familia de compuestos de tipo 4-estirilpiridina es la más activa (compuestos **II.4**, **II.5**, **II.6**, **II.8**, **II.9** y **II.10**). Los compuestos de la familia de las 2-estirilpiridinas y 3-estirilpiridinas son mucho menos activos ya que sólo tienen un representante en la tabla 4.8 por familia (compuestos **II.15** y **II.17**, respectivamente).

2) Dentro de la familia de las 4-estirilpiridinas, los compuestos más activos son los de tipo 4-(metoxiestiril)piridina. De hecho, los compuestos **II.4** (4-(2-metoxiestiril)piridina) y **II.5** (4-(3-metoxiestiril)piridina) poseen interesantes actividades duales. Mientras que el compuesto **II.4** es capaz de moderar la secreción del VEGF-A al medio de cultivo, también es capaz de reducir la expresión del gen *hTERT*, encargado de activar a la telomerasa. Por otra parte, el compuesto **II.5**

también modula la secreción del VEGF-A, a la vez que reduce la expresión génica de *c-Myc*, factor de transcripción implicado en la activación de múltiples oncogenes.

3) Dentro de la familia de las 4-estirilpiridinas, los compuestos de tipo 4-(hidroxiestiril)piridina (compuestos **II.1-II.3**) no muestran ninguna actividad relevante.

4) Los compuestos de tipo 2-estirilpirimidina (**II.19-II.21**) y 5-estirilpirimidina (**II.22-II.24**) no muestran ninguna actividad biológica relevante frente a las dianas biológicas estudiadas.

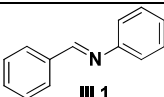
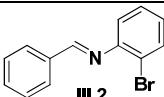
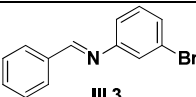
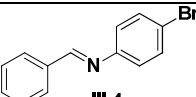
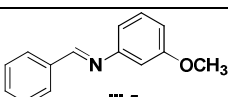
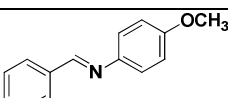
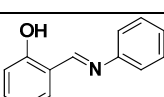
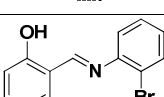
4.4. Evaluación biológica de bencilidenanilinas

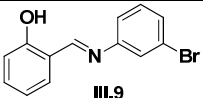
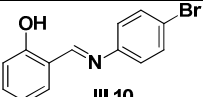
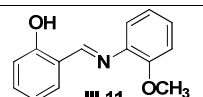
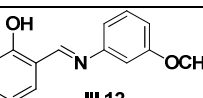
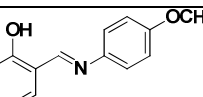
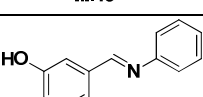
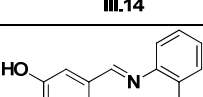
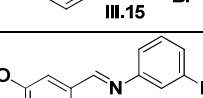
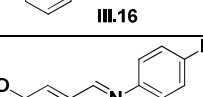
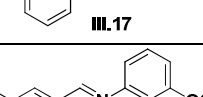
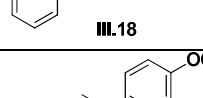
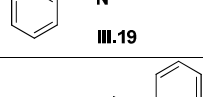
Para la familia de compuestos **III.1-III.28** se llevó a cabo un estudio biológico similar al detallado para la familia de estilbenos más simples.

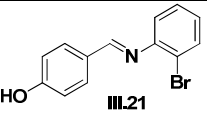
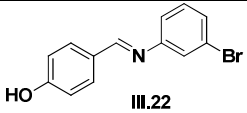
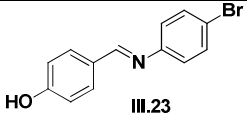
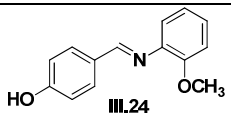
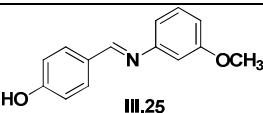
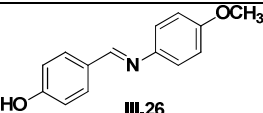
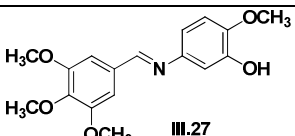
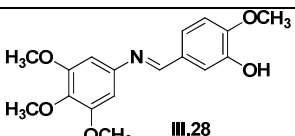
4.4.1. Citotoxicidad

En la tabla 4.9 se reúnen los valores de IC_{50} del resveratrol y de los compuestos **III.1-III.28** después de 72 horas de incubación mediante ensayo con MTT. También se indican los coeficientes α y β .

Tabla 4.9. Valores de IC_{50} ($\mu g/mL$) a 72 h y coeficientes α y β de los compuestos **III.1-III.28**

Compuesto	HT-29	MCF-7	HEK-293	α	β
Resveratrol	$25,8 \pm 1,7$	$13,0 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,6$	0,09	0,18
 III.1	$5,87 \pm 0,23$	$2,95 \pm 0,21$	13 ± 3	2,2	4,4
 III.2	>100	>100	$3,05 \pm 0,18$	<0,03	<0,03
 III.3	>100	$2,4 \pm 0,7$	>100	--	>41,7
 III.4	$6,6 \pm 0,6$	14 ± 5	$2,66 \pm 0,25$	0,40	0,19
 III.5	>100	>100	$0,54 \pm 0,10$	<0,005	<0,005
 III.6	$3,1 \pm 0,8$	$3,0 \pm 0,7$	>100	>32,3	>33,3
 III.7	>100	$4,1 \pm 1,5$	>100	--	>24,4
 III.8	>100	52 ± 3	>100	--	>1,9

 III.9	>100	33 ± 9	52 ± 3	<0,52	1,6
 III.10	5,2 ± 0,6	>100	7,1 ± 0,4	1,4	<0,07
 III.11	>100	>100	2,25 ± 0,28	<0,02	<0,02
 III.12	92 ± 11	96 ± 5	0,25 ± 0,11	0,003	0,003
 III.13	>100	22 ± 9	23,4 ± 4,4	<0,23	1,1
 III.14	>100	>100	2,9 ± 0,6	<0,03	<0,03
 III.15	>100	51 ± 5	17,0 ± 0,5	<0,17	0,33
 III.16	>100	>100	>100	--	--
 III.17	9,7 ± 2,3	14 ± 5	>100	>10,3	>7,1
 III.18	94,73±0,02	64,4 ± 0,7	1,21 ± 0,22	0,013	0,019
 III.19	>100	31 ± 17	6,13 ± 0,23	<0,06	0,20
 III.20	6,27 ± 0,20	19 ± 9	>100	>15,9	>5,3

 III.21	>100	>100	8,47 ± 0,19	<0,08	<0,08
 III.22	>100	15 ± 3	>100	--	>6,7
 III.23	>100	35,8 ± 1,0	>100	--	>2,8
 III.24	96 ± 6	>100	5,8 ± 0,3	0,06	<0,06
 III.25	58 ± 8	98 ± 3	0,57 ± 0,12	0,009	0,006
 III.26	28 ± 9	>100	>100	>3,6	--
 III.27	>100	61 ± 3	5,6 ± 0,3	<0,06	0,09
 III.28	85 ± 11	>100	39,1 ± 2,1	0,5	0,4

Los compuestos más citotóxicos en la línea celular HT-29 son **III.1**, **III.4**, **III.6**, **III.10**, **III.17** y **III.20**, con valores de IC_{50} de 5,87, 6,6, 3,1, 5,2, 9,7 y 6,27 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En la línea celular MCF-7 los más activos son los compuestos **III.1**, **III.3**, **III.6** y **III.7**, con valores de IC_{50} de 2,95, 2,4, 3,0 y 4,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Por lo que respecta a los coeficientes de selectividad α y β , los compuestos **III.1**, **III.6**, **III.17** y **III.20** presentan citotoxicidad selectiva hacia las células HT-29 y MCF-7 frente a las células HEK-293 simultáneamente (valores de α y β superiores a la unidad).

Los compuestos **III.10** y **III.26** presentan citotoxicidad selectiva hacia las células HT-29 frente a las células HEK-293 (valores de α de 1,4 y 3,6, respectivamente), mientras que los compuestos **III.3**, **III.7**, **III.8**, **III.9**, **III.13**, **III.22** y **III.23** presentan citotoxicidad selectiva hacia células MCF-7 frente a HEK-293 (valores de β de 41,7, 24,4, 1,9, 1,6, 1,1, 6,7 y 2,8, respectivamente).

En la figura 4.30 se representan los valores de β frente a α de los compuestos **III.1-III.13**, junto con el **III.27** y el **III.28**. Los compuestos que combinan valores altos, superiores a la unidad, en ambos coeficientes se encuentran en el cuadrante superior derecha de ambas gráficas, y son el **III.1** y el **III.6**.

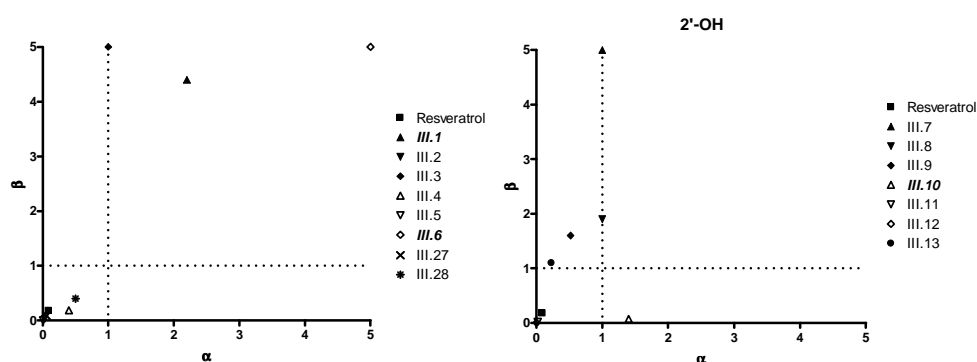


Figura 4.30. Representación de coeficientes β frente α (compuestos **III.1-III.13**, **III.27** y **III.28**). En los casos de valores elevados en los coeficientes se ha utilizado el número 5 como máximo para facilitar la visualización de la gráfica.

En la figura 4.31 se representan los valores de β frente a α de los compuestos **III.14-III.26**. Los compuestos que combinan valores altos, superiores a la unidad, en ambos coeficientes son el **III.17** y el **III.20**, y se encuentran situados en el cuadrante superior derecha de ambas gráficas.

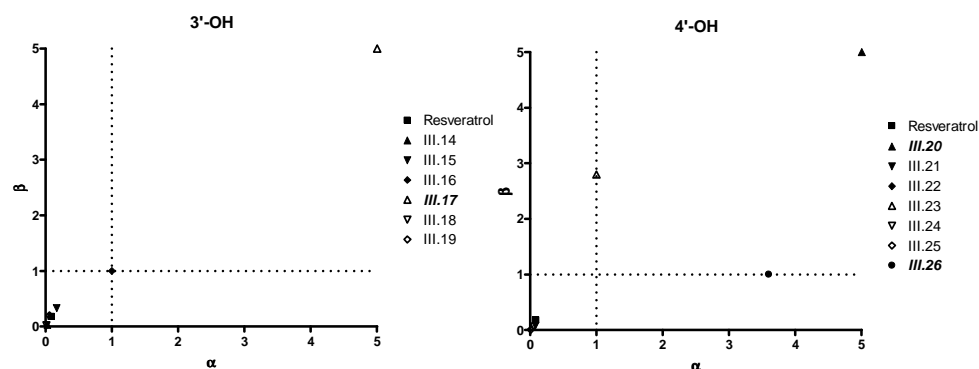
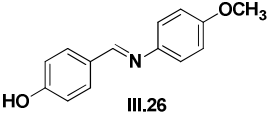
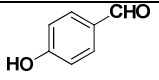
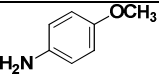
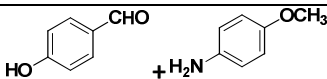


Figura 4.31. Representación de coeficientes β frente α (compuestos **III.14-III.26**). En los casos de valores elevados en los coeficientes se ha utilizado el número 5 como máximo para facilitar la visualización de la gráfica.

Con el fin de comprobar si el enlace de tipo imina permanecía estable dentro de la célula, se determinó el IC_{50} del *p*-hidroxibenzaldehído y de la *p*-metoxianilina, componentes de la imina **III.26**, así como de una mezcla equimolar formada por ambos compuestos. En la tabla 4.10 se muestran los valores obtenidos tras 72 horas de incubación mediante ensayo con MTT. También se indican los coeficientes α y β .

Tabla 4.10. Valores de IC_{50} ($\mu g/mL$) a 72 h y coeficientes α y β del compuestos **III.26** y sus componentes

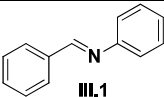
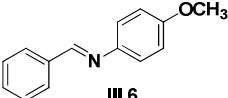
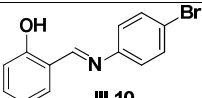
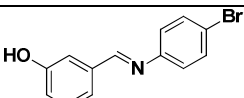
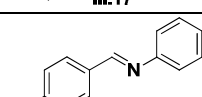
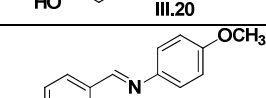
Compuesto	HT-29	MCF-7	HEK-293	α	β
 III.26	28 ± 9	>100	>100	$>3,6$	--
 $HO-C_6H_4-CHO$	$111,9 \pm 2,4$	77 ± 10	30 ± 3	0,03	0,05
 $H_2N-C_6H_4-OCH_3$	65 ± 7	31 ± 10	$5,0 \pm 0,6$	0,01	0,02
 $HO-C_6H_4-CHO + H_2N-C_6H_4-OCH_3$	134 ± 7	81 ± 8	$14,5 \pm 1,7$	0,03	0,04

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que tanto el *p*-hidroxibenzaldehído como la *p*-metoxianilina son mucho más citotóxicas para las células HEK-293 que para las tumorales HT-29 y MCF-7, tanto por separado como en

la mezcla equimolar, ya que los valores de α y β obtenidos son muy inferiores a la unidad. Además, la imina **III.26** presenta una citotoxicidad mayor en células HT-29 que en la mostrada por la mezcla equimolar siendo, además, la imina **III.26** menos tóxica que la mezcla equimolar para las células no tumorales HEK-293. Todos estos resultados ponen de manifiesto que la imina mantiene su integridad estructural bajo las condiciones en las que se mide la citotoxicidad.

Para los siguientes ensayos biológicos se eligieron los compuestos **III.1**, **III.6**, **III.10**, **III.17**, **III.20** y **III.26**, que presentaban un coeficiente de selectividad α superior a la unidad (mayor citotoxicidad en la línea tumoral HT-29 que en la línea no tumoral HEK-293). En todos los casos se trabajó con concentraciones inferiores a las del valor de IC_{50} . En la tabla 4.11 se indican las concentraciones empleadas para cada uno de los compuestos.

Tabla 4.11. Concentraciones de trabajo

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Resveratrol	10
 III.1	5
 III.6	5
 III.10	5
 III.17	9
 III.20	5
 III.26	25

4.4.2. Estudio de la inhibición de la proliferación celular

Para comprobar que las concentraciones de trabajo habían sido elegidas correctamente, se determinó la proliferación celular de las células HT-29 incubándolas durante 72 horas en presencia de las concentraciones de compuesto indicadas en la tabla 4.11. Transcurrido dicho tiempo, se contó el número de células que había en cada uno de los pocillos utilizando una cámara de Neubauer y azul de tripano como colorante. Los resultados obtenidos se representan en la figura 4.32.

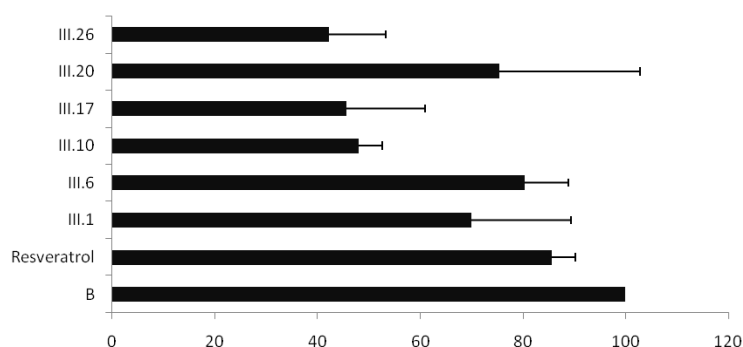


Figura 4.32. Proliferación celular sobre células HT-29 a 72 h.

De la figura anterior se deduce que las concentraciones elegidas para realizar los subsiguientes análisis biológicos eran correctas, puesto que, después de 72 horas, el porcentaje de células vivas en todos los casos es igual o superior al 50%.

4.4.3. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF en células HT-29

La secreción de la proteína VEGF se midió mediante el ensayo ELISA. Los resultados obtenidos, después de 72 horas de incubación utilizando los compuestos seleccionados con las concentraciones mostradas en la tabla 4.11, incluyendo el resveratrol, y comparando los resultados con un control positivo de células tratadas con DMSO, se muestran de manera gráfica en la figura 4.33.

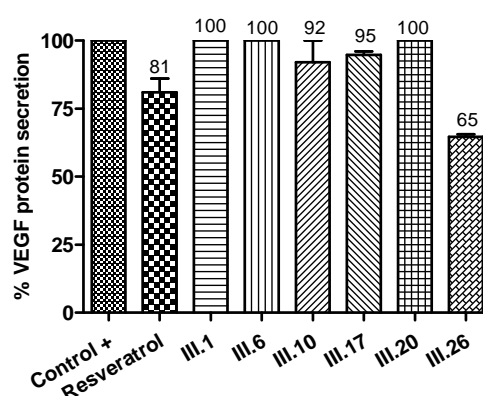


Figura 4.33. Porcentaje de secreción de la proteína VEGF en células HT-29.

El compuesto que provoca mayor inhibición de la secreción de VEGF es el **III.26**, capaz de mostrar un 35% de inhibición, valor superior al que exhibe el resveratrol, que es del 19%.

4.4.4. Inhibición de la expresión génica de *VEGF* en células HT-29

La inhibición del gen *VEGF* se midió mediante la técnica de PCR tradicional y gel de agarosa. Para ello, las células se incubaron durante 72 h en presencia de cada uno de los compuestos a las concentraciones mostradas en la tabla 4.11, incluyendo el resveratrol. Transcurrido dicho tiempo se extrajo el ARN, se retrotranscribió a ADN, se amplificó utilizando la β -actina como control endógeno y se eluyó en un gel de agarosa utilizando el bromuro de etidio como agente intercalante. En la figura 4.34 se muestra la fotografía de los geles de agarosa, que muestran la amplificación de los genes *VEGF* y β -actina para cada muestra, así como la cuantificación de los mismos tras normalizar los resultados con una muestra control formada por células tratadas con DMSO.

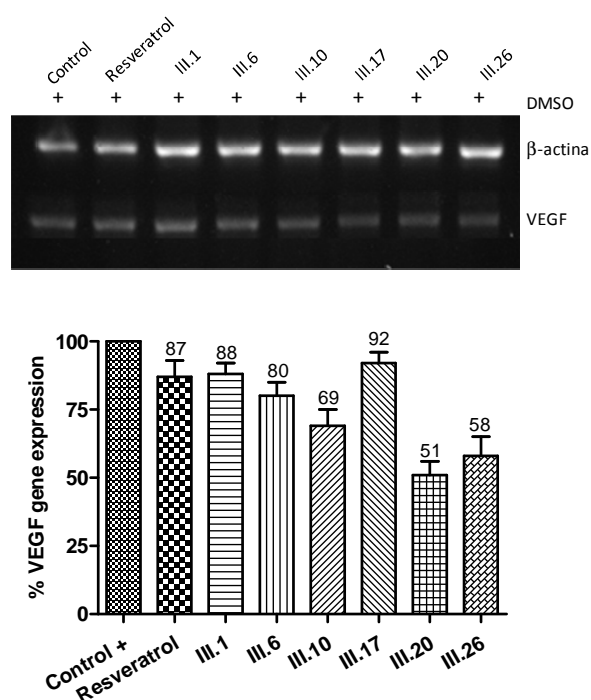


Figura 4.34. Porcentaje de expresión del gen *VEGF* mediante ensayo de PCR y gel de agarosa.

Los compuestos que provocan mayor inhibición del gen *VEGF* son el **III.20** y el **III.26**, que exhiben porcentajes de inhibición del 49% y 42%, respectivamente, valores superiores a los mostrados por el resveratrol, capaz de inhibir un 13% la expresión del gen *VEGF*.

4.4.5. Inhibición de la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* en células HT-29

La inhibición de los genes *hTERT* y *c-Myc* se midió mediante la técnica de PCR tradicional y gel de agarosa, utilizando el bromuro de etidio como agente intercalante, después de incubación de las células en presencia de los compuestos a las concentraciones mostradas en la tabla 4.11 durante 72 horas. Los resultados se compararon con una muestra de células tratadas con DMSO y la *β-actina* se utilizó como gen endógeno. En la figura 4.35 se muestran los resultados obtenidos en el gel para los genes *β-actina*, *hTERT* y *c-Myc* y la cuantificación de los mismos.

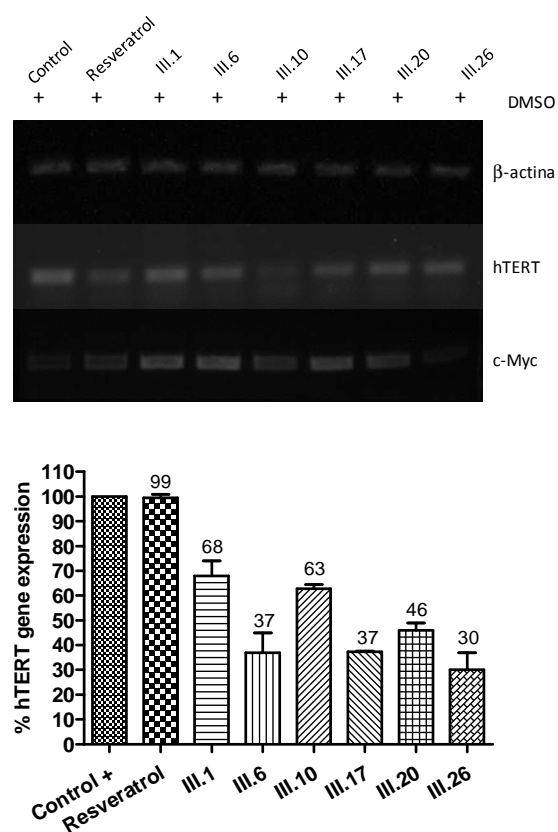


Figura 4.35. Porcentaje de expresión del gen *hTERT* mediante ensayo de PCR y gel de agarosa.

Se puede apreciar en la foto del gel de agarosa que ninguno de los compuestos es capaz de inhibir el gen *c-Myc*.

Por otro lado, compuestos **III.6**, **III.17**, **III.20** y **III.26** si que inhiben la expresión del gen *hTERT*, con valores del 63, 63, 54 y 70%, respectivamente, presentando una inhibición mucho mayor a la mostrada por el resveratrol, el cual inhibe un 1% la expresión del gen *hTERT*.

4.4.6. Conclusiones

En la figura 4.36 se representan los valores de expresión del gen *hTERT* frente a inhibición del gen *VEGF*. Los compuestos que combinan relativamente altas inhibiciones sobre ambas dianas biológicas se sitúan en el cuadrante inferior derecha y son el **III.20** y el **III.26**.

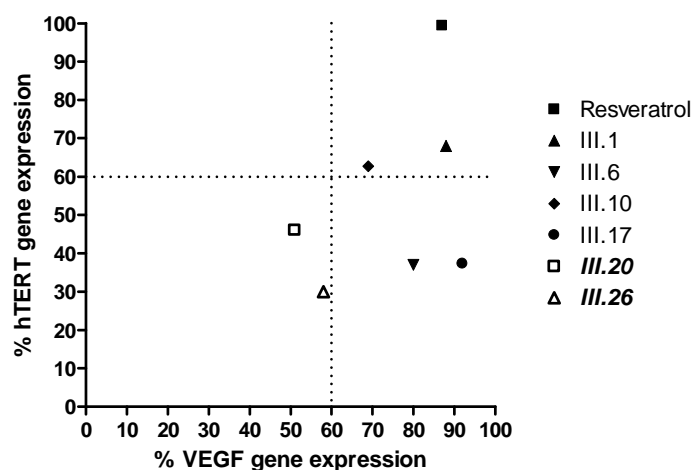
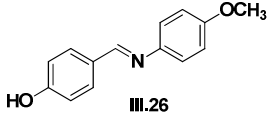
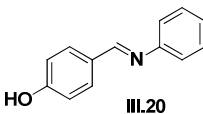
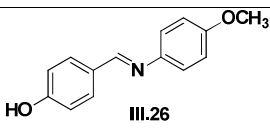
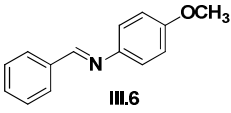
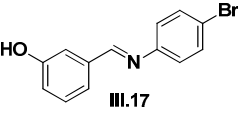
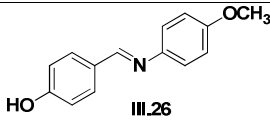
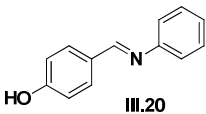
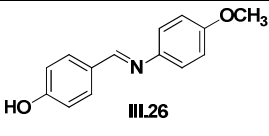


Figura 4.36. Valores de expresión del gen *hTERT* frente al gen *VEGF*.

En la tabla 4.12 se reúnen los compuestos más activos frente a las diferentes dianas biológicas.

Tabla 4.12. Compuestos más activos

Diana biol.	Compuestos con mayor actividad		
Secreción de VEGF	 III.26		
Inhibic. gen <i>VEGF</i>	 III.20	 III.26	
Inhibic. gen <i>hTERT</i>	 III.6	 III.17	 III.26

<p>Inhibic. gen VEGF + gen hTERT</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>III.20</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>III.26</p> </div> </div>
---	--

De la tabla anterior se concluye que:

1) El compuesto más activo es el **III.26** (*N*-4-hidroxibenciliden-4-metoxianilina), puesto que es capaz de reducir la secreción del VEGF, modulando su expresión génica, y también es capaz de reducir la expresión del gen *hTERT*.

2) El compuesto **III.20** (*N*-4-hidroxibencilidenanilina) se puede considerar como el segundo más activo, pues es capaz de reducir la expresión génica de *VEGF* y de *hTERT*.

3) El compuesto **III.6** es la *N*-benciliden-4-metoxianilina, y sólo regula significativamente la expresión de *hTERT*.

4) La bencilidenanilina (compuesto **III.1**) no muestra ninguna actividad en la inhibición de la secreción de VEGF, y sólo inhibe un 12% la expresión del gen VEGF y un 32% la expresión del gen *hTERT*. La presencia de un sustituyente metoxilo (compuesto **III.6**) o hidroxilo (compuesto **III.20**) aumenta la actividad. Cuando se combinan estos dos sustituyentes en posición relativa *para* se genera formalmente el compuesto **III.26**, que es el que exhibe mayor actividad biológica.

5) De todas las familias de compuestos estudiadas en esta Tesis, la de los iminoderivados es la que presenta menores actividades biológicas. De hecho, ninguno de los miembros de esta familia inhibe la expresión del gen *c-Myc*.

4.5. Evaluación biológica de sulfatos, acil y glucosílderivados de resveratrol

En colaboración con el grupo del Dr. Juan Carlos Morales (Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC-Universidad de Sevilla) se llevó a cabo la evaluación biológica de sulfatos, acil y glucosílderivados de resveratrol cuyas estructuras se muestran en la figura 4.37. Estos compuestos fueron sintetizados en los laboratorios del Dr. J. C. Morales.³⁸⁷

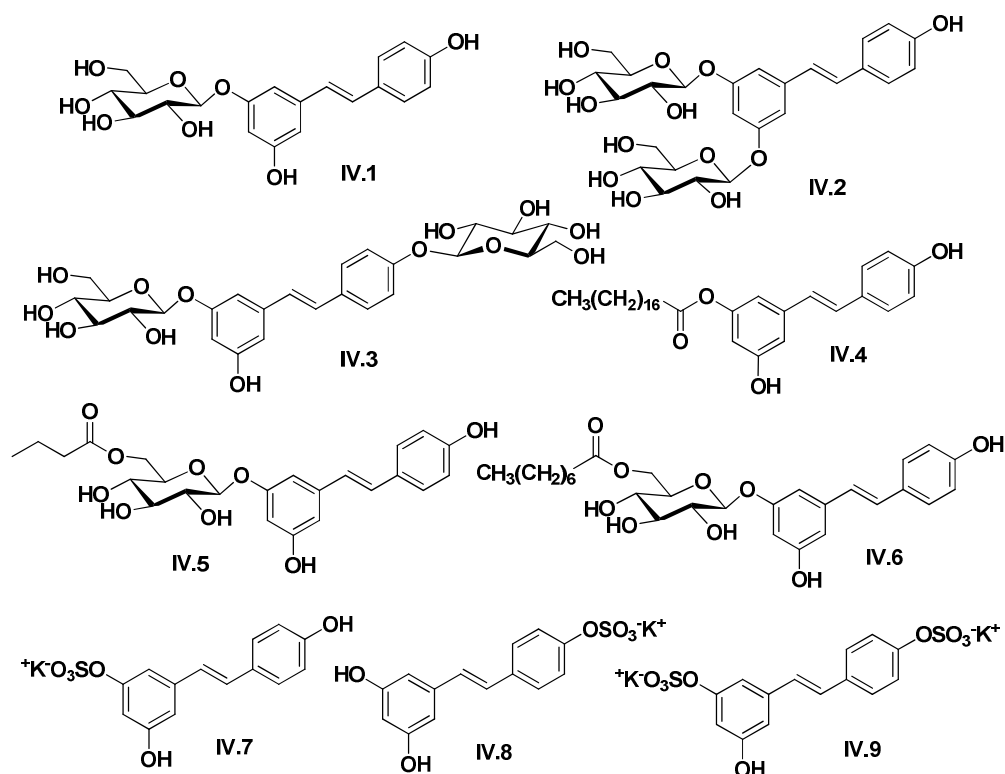


Figura 4.37. Sulfatos, acil y glucosílderivados de resveratrol.

³⁸⁷ (a) Larrosa, M.; Tome-Carneiro, J.; Yanez-Gascon, M. J.; Alcantara, D.; Selma, M. V.; Beltran, D.; Garcia-Conesa, M. T.; Urban, C.; Lucas, R.; Tomas-Barberan, F.; Morales, J. C.; Espin, J. C., *J Med Chem* **2010**, *53*, 7365-7376. Los sulfatos de resveratrol se sintetizaron mediante modificaciones experimentales de metodologías previamente publicadas, véase: (b) Hoshino, J.; Park, E. J.; Kondratyuk, T. P.; Marler, L.; Pezzuto, J. M.; van Breemen, R. B.; Mo, S.; Li, Y.; Cushman, M. *J Med Chem* **2010**, *53*, 5033-43. (c) Raghuraman, A.; Riaz, M.; Hindle, M.; Desai, U. R. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6754-6758. (d) Al-Horani, R. A.; Desai, U. R. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2907-2918.

4.5.1. Citotoxicidad

En la tabla 4.13 se reúnen los valores de IC_{50} de los compuestos **IV.1-IV.9**, junto con el resveratrol, después de 72 horas de incubación y evaluación con MTT. También se indican los valores de los índices α y β .

Tabla 4.13. Valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a 72 h y coeficientes α y β de los compuestos **IV.1-IV.9**

Compuesto	HT-29	MCF-7	HEK-293	α	β
Resveratrol	$16,0 \pm 0,7$	29 ± 5	$2,7 \pm 0,8$	0,2	0,1
IV.1	7 ± 3	15 ± 7	>39	>5,6	>2,6
IV.2	$13,3 \pm 0,3$	40 ± 10	>55	>4,1	>1,4
IV.3	25 ± 5	49 ± 9	>55	>2,2	>1,1
IV.4	49 ± 12	57 ± 6	>49,5	>1	>0,9
IV.5	63 ± 9	51 ± 3	>46	>0,7	>0,9
IV.6	20 ± 1	27 ± 1	$7,7 \pm 2,1$	0,4	0,3
IV.7	40 ± 6	$5,9 \pm 0,3$	>34,6	>0,9	>5,9
IV.8	>34,6	50 ± 11	>34,6	--	>0,7
IV.9	$26,0 \pm 1,9$	$12,1 \pm 1,9$	>46,5	>1,8	>3,8

Los valores de citotoxicidad se encuentran en su mayoría en el rango micromolar medio-alto. Los compuestos más citotóxicos en la línea celular HT-29 son **IV.1** y **IV.2** (valores de IC_{50} de 7 y 13,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), con valores de IC_{50} inferiores a los del resveratrol (16,0 $\mu\text{g/mL}$).

Los más citotóxicos en la línea celular MCF-7 son **IV.1**, **IV.7** y **IV.9** (valores de IC_{50} de 15, 5,9 y 12,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), que son más activos que el propio resveratrol (IC_{50} de 29 $\mu\text{g/mL}$).

En la figura 4.38 se representan los valores de β frente a α para los compuestos **IV.1-IV.9**. Los compuestos que combinan valores altos de ambos coeficientes se sitúan en el cuadrante superior derecha y son los derivados glucosídicos **IV.1**, **IV.2** y **IV.3** y el compuesto sulfatado **IV.9**. Estos compuestos son más citotóxicos para las dos líneas de células tumorales que para la línea no tumoral HEK-293.

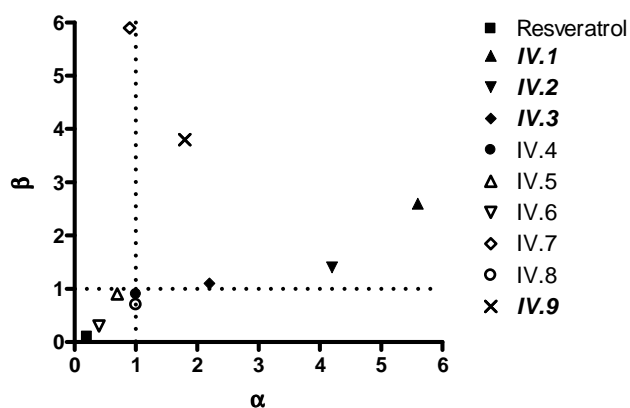


Figura 4.38. Representación de coeficientes β frente α para los compuestos IV.1-IV.9.

Los compuestos seleccionados para la medición de los siguientes ensayos biológicos fueron IV.1, IV.2, IV.6, IV.7, IV.8 y IV.9. Esta selección se hizo en base a los valores de IC_{50} en la línea celular HT-29. El compuesto IV.8 no es muy citotóxico pero se eligió a fin de poder compararlo con los otros dos compuestos sulfatados. Se decidió trabajar en los siguientes ensayos con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ para cada uno de los compuestos y una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ para el resveratrol.

4.5.2. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF en células HT-29

La medición de la secreción de la proteína VEGF se llevó a cabo con el ensayo ELISA. Para ello se incubaron, durante 72 horas, las células HT-29 junto con los compuestos seleccionados a las concentraciones anteriormente descritas, incluyendo el resveratrol. Los resultados se compararon con una muestra de células tratadas con DMSO y se muestran en la figura 4.39.

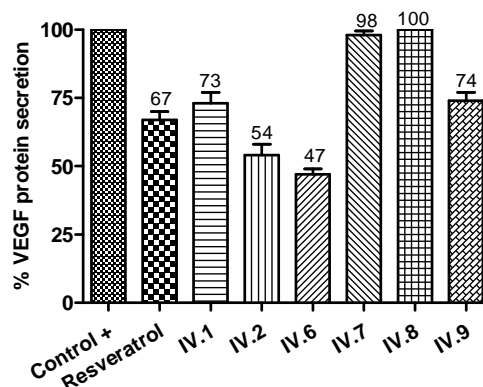


Figura 4.39. Porcentaje de secreción de la proteína VEGF en células HT-29.

Los compuestos más activos en la inhibición de la secreción de la proteína VEGF son el **IV.2** y el **IV.6**, que muestran valores de inhibición de un 46 y un 53%, respectivamente. La actividad inhibitoria de estos compuestos es superior a la del resveratrol (33% de inhibición) que además se empleó en una concentración dos veces superior.

De entre los derivados sulfatados, los compuestos **IV.7** y **IV.8** no inhiben la secreción de VEGF y el compuesto **IV.9** la inhibe ligeramente (26% de inhibición).

4.5.3. Inhibición de la expresión del gen *hTERT* en células HT-29

La medición de la inhibición de la expresión del gen *hTERT* se llevó a cabo con la técnica qPCR, incubando las células HT-29 durante 48 horas en presencia de los compuestos a las concentraciones de trabajo anteriormente citadas y comparando los resultados con células tratadas con DMSO y utilizando la *β-actina* como gen endógeno. En la figura 4.40 se representan los resultados obtenidos.

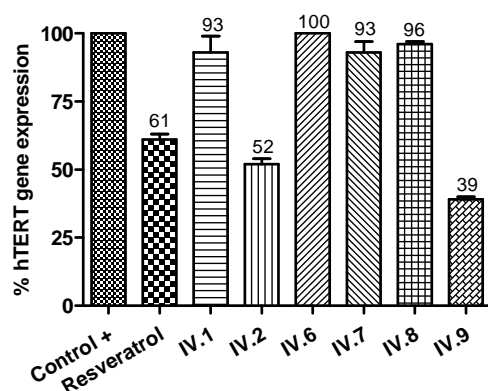


Figura 4.40. Porcentaje de expresión del gen *hTERT* en células HT-29.

Los compuestos más activos en la inhibición de la expresión del gen *hTERT* son **IV.2** y **IV.9**, con un 48 y 61% de inhibición, respectivamente, valores ligeramente superiores al mostrado por el resveratrol (39% de inhibición), el cual se ensayó al doble de concentración.

4.5.4. Inhibición de la expresión del gen *c-Myc* en células HT-29

La medición de la inhibición de la expresión del gen *c-Myc* se llevó a cabo con la técnica qPCR, incubando las células HT-29 durante 48 horas en presencia de los compuestos a las concentraciones de trabajo elegidas anteriormente. Las muestras se normalizaron respecto a un control de células tratadas con DMSO y la *β-actina* se utilizó como gen endógeno. En la figura 4.41 se representan los resultados obtenidos.

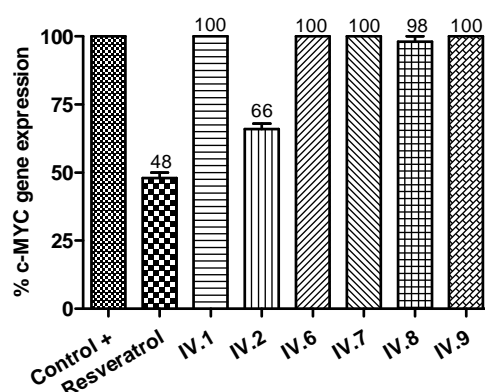


Figura 4.41. Porcentaje de expresión del gen *c-Myc* en células HT-29.

Ninguno de los compuestos ensayados presenta una alta capacidad de inhibición del gen *c-Myc*, siendo el compuesto **IV.2** el único ligeramente activo, con una inhibición del 34%, menor a la que exhibe el resveratrol, que es del 52%.

Tanto el compuesto **IV.2** como el resveratrol muestran una correlación en la inhibición de los genes *hTERT* y *c-Myc*. Esto podría indicar que la inhibición del gen *hTERT* viene marcada por la inhibición en la expresión del gen *c-Myc*. Sin embargo, en el compuesto **IV.9** no se observa esta correlación, lo cual que indicaría que la disminución en la expresión del gen *hTERT* vendría marcada por otro mecanismo regulador diferente.

4.5.5. Conclusiones

En la figura 4.42 se representan los porcentajes de expresión del gen *hTERT* frente a los porcentajes de secreción de la proteína VEGF. El compuesto que combina mayores porcentajes de inhibición simultáneamente es el **IV.2** y, por tanto, se encuentra ubicado en el cuadrante inferior izquierda de la figura 4.42.

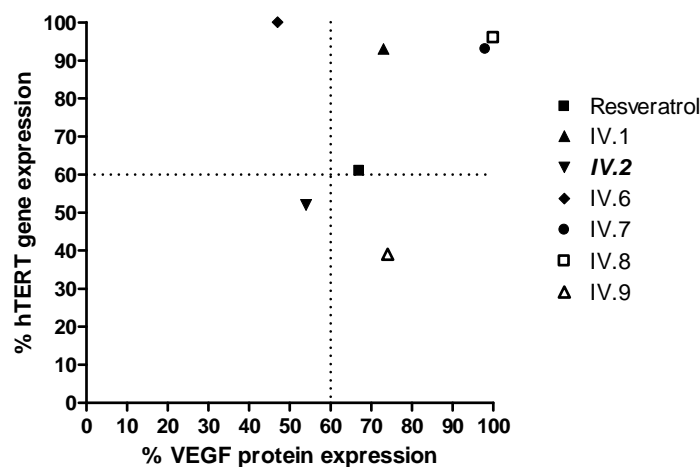


Figura 4.42. Valores de expresión del gen *hTERT* frente a la secreción de la proteína VEGF.

Las conclusiones de este apartado son las siguientes:

1) De entre los glucosilderivados, el compuesto **IV.2** es el más activo. Su citotoxicidad es superior a la del resveratrol en la línea celular tumoral HT-29, siendo además muy poco tóxico en la línea celular no tumoral HEK-293. También es, de entre los glucosilderivados, el que exhibe mayores inhibiciones de las expresiones de los genes *hTERT* y *c-Myc* y inhibe de la secreción de la proteína VEGF a la mitad, aproximadamente.

2) De entre los derivados sulfatados, el compuesto **IV.9** es el más activo. Su citotoxicidad es superior a la del resveratrol en la línea celular tumoral MCF-7, siendo además muy poco tóxico en la línea celular no tumoral HEK-293. También es, de entre los derivados sulfatados, el que exhibe mayor inhibición de la secreción de la proteína VEGF y mayor inhibición de la expresión del gen *hTERT*.

4.6. Experimental

4.6.1. Cultivos celulares

Las células de adenocarcinoma de colon humano HT-29, de adenocarcinoma de mama MCF-7 y las células embrionarias de riñón humano HEK-293 se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FBS, 1% de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina tal como se describe en la bibliografía.³⁸⁸

Las células BAEC se cultivaron en DMEM bajo en glucosa suplementado con un 10% de FBS, 1% de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de anfotericina.

Todos los derivados de resveratrol sintetizados se disolvieron en DMSO hasta una concentración de 10 mg/mL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.6.2. Ensayos de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad se realizó con células HT-29, MCF-7, HEK-293 y BAEC mediante ensayo con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).³⁸⁹ Se sembraron 5×10^3 células por pocillo (HT-29, o MCF-7, o HEK-293 o BAEC) en placas de 96 pocillos con un volumen de 80 μ L de medio de cultivo y se dejaron incubando durante 24 h. Después de este periodo de tiempo se añadió a cada pocillo 20 μ L de cada una de las diluciones de los distintos compuestos a ensayar y se dejaron incubar durante 2 o 3 días dependiendo del ensayo (37°C, 5% CO₂ en una atmósfera húmeda). Luego se añadieron a cada pocillo 10 μ L de MTT (5 mg/mL en PBS) y se incubaron durante 3 h a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. A continuación se eliminó el medio de cultivo, el formazán formado se disolvió con 100 μ L de DMSO y se midió la absorbancia a 492 nm. Todas las medidas se efectuaron al menos por triplicado.

³⁸⁸ Buey, R. M.; Calvo, E.; Barasoain, I.; Pineda, O.; Edler, M. C.; Matesanz, R.; Cerezo, G.; Vanderwal, C. D.; Day, B. W.; Sorensen, E. J.; López, J. A.; Andreu, J. M.; Hamel, E.; Díaz, J. F. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 117.

³⁸⁹ Yang, C.; Barasoain, I.; Li, X.; Matesanz, R.; Liu, R.; Sharom, F. J.; Yin, D. L.; Díaz, J. F.; Fang, W. S. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 691.

4.6.3. Ensayos de proliferación celular

La medida de la proliferación celular se efectuó sobre células HT-29. Para ello, se sembraron unas 100.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar 24 horas con 1,5 mL de medio de cultivo. A continuación se cambió el medio de cultivo y se añadió a cada uno de los pocillos los compuestos a ensayar a las concentraciones correspondientes. A la muestra correspondiente al control se le añadió la misma cantidad de DMSO que la empleada para disolver los compuestos. Las células se incubaron durante 48 o 72 horas en presencia de los compuestos. Transcurrido dicho tiempo se recogieron las células, se diluyeron a la mitad con azul de tripano y se contó el número de células utilizando una cámara de Neubauer. El ensayo se realizó por triplicado.

4.6.4. Ensayo ELISA para la determinación de la producción de VEGF protéico secretado en el medio de cultivo

La medida de la producción de la proteína VEGF se efectuó sobre células HT-29. Para ello, se sembraron unas 100.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar 24 horas con 1,5 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo y se añadió a cada uno de los pocillos los compuestos a ensayar a las concentraciones correspondientes. A la muestra correspondiente al control se le añadió la misma cantidad de DMSO que la empleada para disolver los compuestos. Las células se incubaron durante 72 horas en presencia de los compuestos. Transcurrido dicho tiempo se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y éstos se emplearon para medir el VEGF secretado por las células HT-29 siguiendo las instrucciones del kit ELISA de detección de VEGF humano de Invitrogen. El ensayo se realizó por triplicado.

4.6.5. Determinación de la expresión génica de *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc*

Para la determinación de la expresión de los genes *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc* se sembraron unas 100.000 células HT-29 por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar 24 horas con 1,5 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo y se añadió a cada uno de los pocillos cada uno de los compuestos a ensayar en las concentraciones indicadas en cada caso. A la muestra que

correspondía al control se le añadió la misma cantidad de DMSO que la empleada para disolver los compuestos. Las células se incubaron durante 48 horas (en algunos casos se dejó la incubación durante 72 horas) en presencia de los compuestos. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron y el ARN se aisló usando el kit de extracción de Ambion. Luego se sintetizó el ADN complementario mediante el empleo de la retrotranscriptasa MMLV, 1-21 µg del ARN extraído y oligo(dT)15 siguiendo el protocolo .

Cuando se utilizó la técnica de PCR convencional la amplificación de los genes se efectuó mediante el empleo de cebadores específicos (véase tabla 4.14) utilizando las siguientes condiciones experimentales:

β-actina: 94°C durante 30 s, 58°C durante 50 s y 72°C durante 50 s 30 ciclos.

VEGF: 94°C durante 30 s, 58°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min 50 s 30 ciclos.

hTERT: 94°C durante 1 min, 57°C durante 1 min y 72°C durante 1 min 30 s 30 ciclos.

c-Myc: 94°C durante 30 s, 58°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min 50 s 30 ciclos.

Tabla 4.14. Cebadores y pares de bases usados en PCR

Gen	Cebador	Pares de bases
<i>β-actina</i>	directo: 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATC CGT-3' inverso: 5'-CGTAGAAGCATTTCGCGTGCACGATG-3	287
<i>VEGF</i>	directo: 5'-CCTGATGAGATCGAGTACATCTT-3' inverso: 5'-ACCGCCTCGGCTTGTCAC-3'	379
<i>hTERT</i>	directo: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' inverso: 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'	145
<i>c-Myc</i>	directo: 5'-AAGTCCTGCGCCTCGCAA-3' inverso: 5'-GCTGTGGCCTCCAGCAGA-3'	249

Los productos obtenidos en la PCR tradicional se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% y se revelaron con bromuro de etidio bajo transiluminación ultravioleta.

Cuando se utilizó la técnica de qPCR la amplificación de los genes se efectuó mediante el empleo de un termociclador StepOnePlus™ y sondas Taqman®. Se utilizó TaqMan® Gene Expression Fast Master Mix, que contiene el tampón adecuado para

las condiciones de amplificación, dNTPs, la enzima ADN polimerasa termoestable y una sonda de referencia pasiva.

Para amplificar cada uno de los genes se utilizaron los cebadores prediseñados y comercializados por Life Technologies TaqMan® Gene Expression Assays, Hs99999903-m1 (*β -actina*), Hs00900055-m1 (*VEGF*), Hs00972646-m1 (*hTERT*) y Hs00153408-m1 (*c-Myc*).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado utilizando dos réplicas térmicas.

4.6.6. Ensayo de tubulogénesis sobre células BAEC

Se introdujo Matrigel (50 μ L en 10,5 mg/mL) a 4°C en placas de 96 pocillos y se dejó polimerizar a 37°C por un mínimo de 30 minutos. A continuación se sembraron unas 50.000 células BAEC por pocillo con 200 μ L de DMEM y se añadieron diferentes cantidades de los compuestos objeto de estudio. Se incubó a 37°C en una cámara humidificada con un 5% de CO₂ durante 7 horas. Transcurrido dicho tiempo, se observaron y fotografiaron las células en una cámara NIKON de microscopio invertido DIAPHOT-TMD (NIKON Corp. Tokyo Japan). Los resultados fueron evaluados por dos observadores diferentes.

4.6.7. Ensayo de migración celular sobre células BAEC

Para realizar el ensayo se sembraron unas 200.000 células BAEC por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar con 1,5 mL de medio de cultivo hasta observar que las células estaban confluentes. En ese momento se realizó una “herida” en forma de cruz con la punta de una pipeta. Se cambió el medio de cultivo con el fin de eliminar las células despegadas y se añadió a cada uno de los pocillos los compuestos a ensayar a las concentraciones objeto de estudio. A la muestra correspondiente al control se le añadió la misma cantidad de DMSO que la empleada para disolver los compuestos. Se tomaron fotos de las células a las 0 h, a las 18 h y a las 24 h.

CAPÍTULO 5

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN

BIOLÓGICA DE

FURILIDENTIAZOLONAS

Y FURILIDEN-

TIOXOTIAZOLIDINONAS

CAPÍTULO 5. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE FURILIDENTIAZOLONAS Y FURILIDENTIOXOTIAZOLIDINONAS

5.1. Antecedentes bibliográficos

Como se ha comentado en el capítulo de introducción, las sirtuinas son enzimas con actividad histona-desacetilasa que presentan relación con la telomerasa a través de la regulación de los genes *hTERT* y *c-Myc*.^{390,391}

En el contexto de esta Tesis, se realizó una estancia de investigación en el año 2013 en los laboratorios del profesor M. Botta en la Università degli Studi di Siena (Italia). Previamente a la realización de dicha estancia, diversos estudios habían demostrado que algunos compuestos derivados del ácido tiobarbitúrico, la estructura de los cuales puede verse en la figura 5.1, eran capaces de inhibir diferentes isoformas de las sirtuinas, tal y como se recoge en la tabla 5.1.^{392,393}

³⁹⁰ Echeverri-Ruíz, N. P.; Mockus-Sivickas, I. *Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia* **2010**, *58*, 221-232.

³⁹¹ Yamashita, S.; Ogawa, K.; Ikei, T.; Udono, M.; Fujiki, T.; Katakura, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *417*, 630-634.

³⁹² Lawson, M.; Uciechowska, U.; Schemies, J.; Rumpf, T.; Jung, M.; Sippl, W. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1799*, 726-739.

³⁹³ Maurer, B.; Rumpf, T.; Scharfe, M.; Stolfa, D.; Schmitt, M.; He, W.; Verdin, E.; Sippl, W.; Jung, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1050-1053.

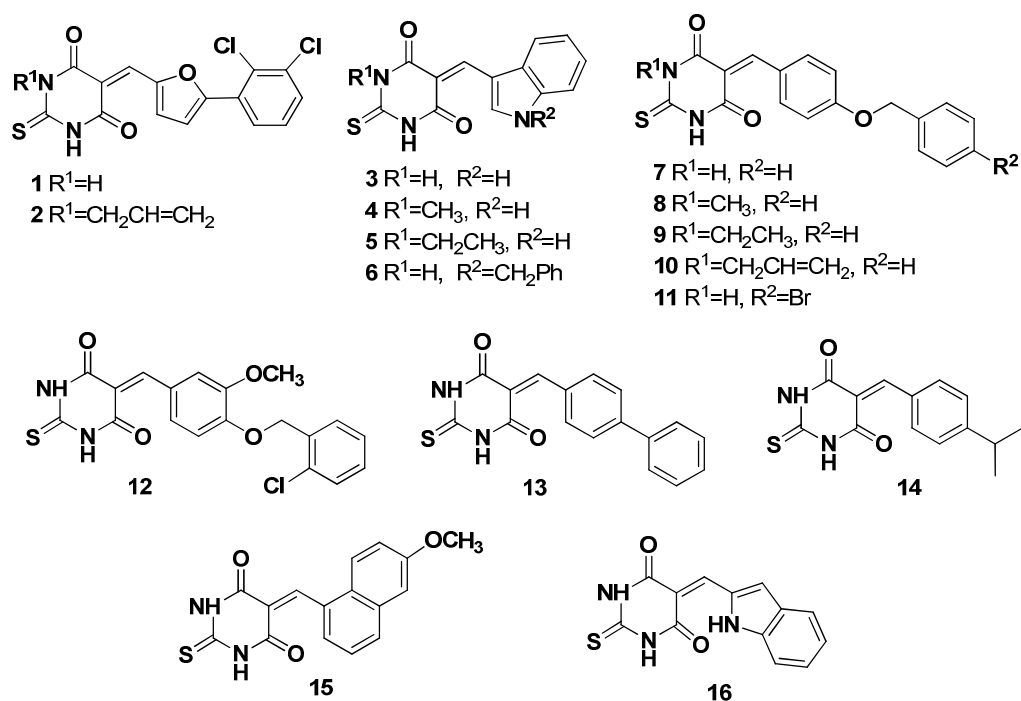


Figura 5.1. Estructuras de inhibidores de sirtuinas derivados del ácido tiobarbitúrico.

Tabla 5.1. Valores de IC_{50} de derivados del ácido tiobarbitúrico

Compuesto	Sirt1	Sirt2	Sirt3	Sirt5
1	$3,4 \pm 0,3$	$10,4 \pm 3,0$	30% a $50 \mu M$	$3,6 \pm 0,2$
2	$5,3 \pm 0,7$	$9,7 \pm 1,6$	41% a $50 \mu M$	$2,3 \pm 0,2$
3	$5,9 \pm 0,3$	$20,3 \pm 1,5$	14% a $50 \mu M$	$46,5 \pm 8,5$
4	$42,4 \pm 7,2$	20% a $50 \mu M$	17% a $50 \mu M$	$27,0 \pm 4,0$
5	$89,3 \pm 11,3$	10% a $50 \mu M$	NI a $50 \mu M$	$55,9 \pm 6,2$
6	$28,4 \pm 1,44$	20% a $50 \mu M$	$116,3 \pm 10,1$	$16,6 \pm 0,4$
7	$10,5 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,8$	$29,3 \pm 3,2$	$12,6 \pm 0,4$
8	$56,5 \pm 3,4$	$10,0 \pm 1,3$	22% a $50 \mu M$	$17,8 \pm 1,2$
9	$53,2 \pm 1,6$	$14,4 \pm 2,3$	25% a $50 \mu M$	$12,9 \pm 0,3$
10	$36,8 \pm 2,3$	NI a $50 \mu M$	13% a $50 \mu M$	$67,3 \pm 5,9$
11	$9,9 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,8$	$30,3 \pm 2,2$	$6,2 \pm 0,8$

12	6,7 ± 1,1	7,5 ± 0,9	46,4 ± 4,6	12,4 ± 5,1
13	50,5 ± 9,1	8,7 ± 0,7	40,3 ± 3,7	30,0 ± 4,1
14	12,4 ± 0,5	14,7 ± 2,1	13% a 50 µM	39,4 ± 12,2
15	6,0 ± 0,6	11,7 ± 2,5	43,3 ± 5,0	22,4 ± 3,8
16	6	20	20% a 50 µM	--

Estos resultados llevaron al grupo del profesor M. Botta a plantear la posibilidad de que compuestos derivados de furilidentiazolonas y furilidentioxotiazolidinonas pudieran exhibir también acción inhibitoria de sirtuinas. Así, durante mi estancia de investigación en los laboratorios del profesor Botta se sintetizaron las furilidentiazolonas **V.1-V.4** y las furilidentioxotiazolidinonas **V.5-V.7**, cuyas estructuras se muestran en la figura 5.2.

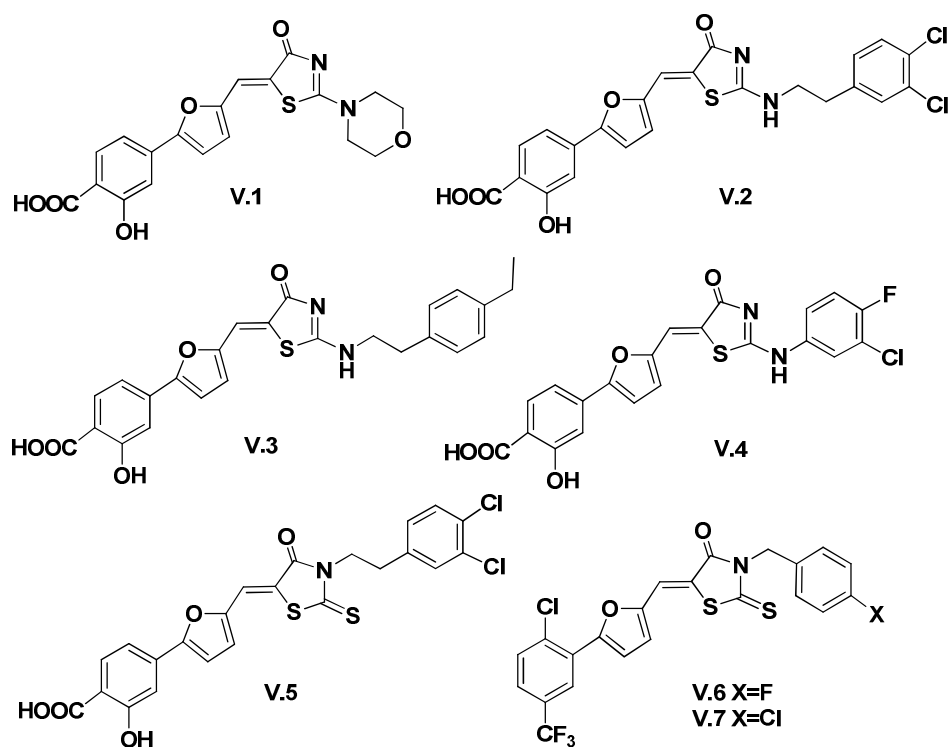
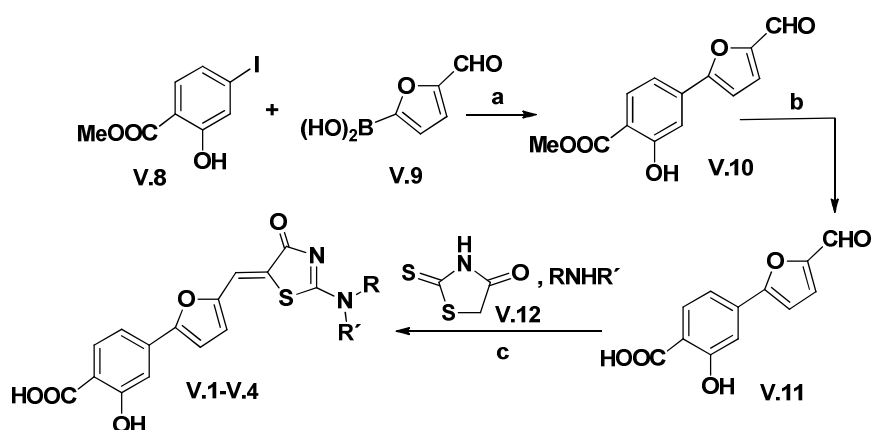


Figura 5.2. Estructuras de furilidentiazolonas y furilidentioxotiazolidinonas.

5.2. Síntesis de 5-furilidentiazolonas

La síntesis de las 5-furilidentiazolonas **V.1-V.4** se llevó a cabo mediante la secuencia de reacciones que se indica en el esquema 5.1. En primer lugar se preparó el 4-(5-formilfuran-2-il)-2-hidroxibenzoato de metilo **V.10** mediante reacción de acoplamiento de Suzuki³⁹⁴ entre el 2-hidroxi-4-yodobenzoato de metilo **V.8** y el ácido (5-formilfuran-2-il)borónico **V.9**. El producto de la reacción **V.10** se convirtió en el correspondiente ácido **V.11** mediante saponificación. La reacción de **V.11** con la 2-tioxotiazolidin-4-ona **V.12** en presencia de la correspondiente amina RNHR', bajo irradiación con microondas, permitió la obtención de las 5-furilidentiazolonas **V.1-V.4**.^{395,396}



Esquema 5.1. (a) Pd(PPh₃)₂Cl₂, Na₂CO₃, DMF/EtOH, t.a., 1 h (87%). (b) NaOH 1 M, THF/MeOH, reflujo, 2 h (99%). (c) 2-tioxotiazolidin-4-ona, amina RNHR', EtOH, MW (300 W), 60°C, 20 min. **V.1** (49%); **V.2** (39%); **V.3** (80%); **V.4** (54%).

5.3. Síntesis de 5-furilidentioxotiazolidinonas

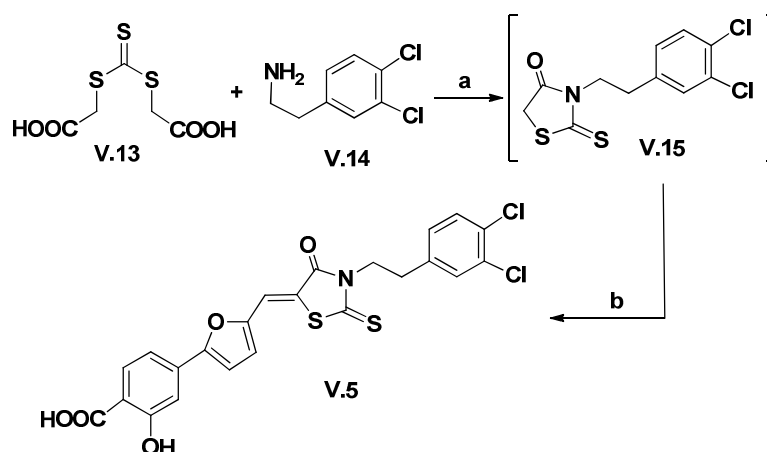
La 5-furilidentioxotiazolidinona **V.5** se obtuvo en un solo paso operativo (*one pot*) en un proceso que constaba de dos etapas. En la primera de ellas se hizo reaccionar el bis(carboximetil)tritiocarbonato **V.13** con la 2-(3,4-diclorofenil)etanamina **V.14**, en

³⁹⁴ Miyauro, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.

³⁹⁵ Bourahla, K.; Derdour, A.; Rahmouni, M.; Carreaux, F.; Bazureau, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 5785-5789.

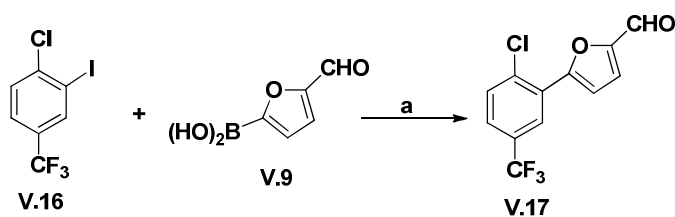
³⁹⁶ Rinaldi, M.; Tintori, C.; Franchi, L.; Vignaroli, G.; Inniter, A.; Massa, S.; Esté, J. A.; Gonzalo, E.; Christ, F.; Debyser, Z.; Botta, M. *ChemMedChem* **2011**, 6, 343-352.

presencia de trietilamina y bajo irradiación con microondas durante 10 minutos, lo que condujo a la formación de la *N*-alquil-2-tioxotiazolidin-4-ona **V.15** (véase el esquema 5.2). En la segunda etapa, se añadió el ácido **V.11** a la mezcla de reacción que contenía el compuesto **V.15** y se calentó bajo irradiación con microondas durante 5 minutos, generándose bajo estas condiciones la 5-furilidentioxotiazolidinona **V.5**.^{396,397}



Esquema 5.2. (a) DME, Et₃N, MW (300 W), 90°C, 10 min. (b) **V.11**, MW (300 W), 110°C, 5 min. (29%).

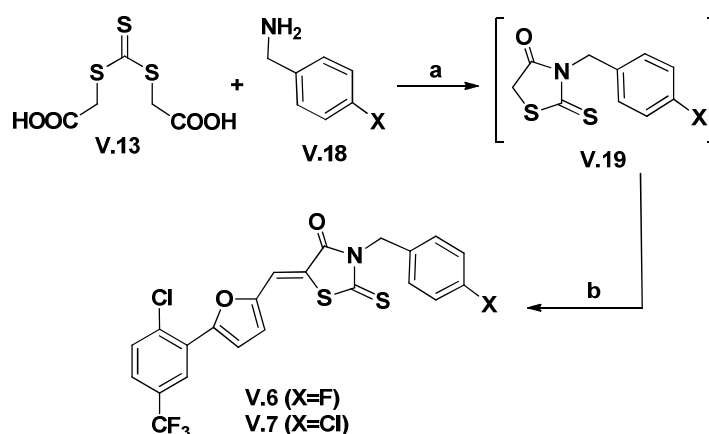
Para la síntesis de las furilidentioxotiazolidinonas **V.6-V.7** se hizo necesaria en primer lugar la preparación del 5-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)furan-2-carbaldehído **V.17**, que se obtuvo mediante reacción de Suzuki entre el 1-cloro-2-yodo-4-(trifluorometil)benceno **V.16** y el ácido (5-formilfuran-2-il)borónico **V.9** (véase el esquema 5.3).



Esquema 5.3. (a) Pd(PPh₃)₄Cl₂, Na₂CO₃, DMF/EtOH, t.a., 1 h (64%).

³⁹⁷ Radi, M.; Botta, L.; Casaluce, G.; Bernardini, M.; Botta, M. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 200-205.

Una vez obtenido el furanocarbaldehído **V.17** se procedió a la preparación de las furilidentioxotiazolidinonas **V.6-V.7** siguiendo el mismo procedimiento empleado en la síntesis del compuesto **V.5**. Así, el bis(carboximetil)tritiocarbonato **V.13** se hizo reaccionar con la correspondiente (4-halofenil)metanamina **V.18** en presencia de trietilamina y bajo irradiación con microondas (véase el esquema 5.4). En estas condiciones se generaron las correspondientes 3-(4-halobencil)-2-tioxotiazolidin-4-onas **V.19**, las cuales, a continuación, se hicieron reaccionar con el furanocarbaldehído **V.17** bajo irradiación con microondas, lo que condujo a la obtención de las furilidentioxotiazolidinonas **V.6-V.7** (véase el esquema 5.4).^{396,397}



Esquema 5.4. (a) DME, Et₃N, MW (300 W), 90°C, 10 min. (b) **V.17**, MW (300 W), 110°C, 5 min. **V.6** (18%); **V.7** (54%).

5.4. Ensayos biológicos

Los compuestos sintetizados fueron estudiados computacionalmente en la Universidad de Siena y se determinó que podían poseer capacidad anti-VIH, por lo que una muestra de cada compuesto se mandó a los laboratorios del profesor Z. Debyser, de la universidad de Lovaina (KU Leuven, Bélgica), a fin de realizar los ensayos biológicos referentes a su acción anti-VIH.

Otra muestra de cada uno de los compuestos sintetizados se envió al grupo de investigación del profesor M. Jüng, de la Universidad de Freiburg (Alemania), para evaluar su capacidad inhibitoria frente a diferentes isoformas de sirtuinas.

La citotoxicidad de los compuestos sintéticos sobre células HT-29, MCF-7, HEK-293 y BAEC, así como la capacidad inhibitoria de la secreción de VEGF y de expresión de los genes de *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc* se midió en nuestros laboratorios de la Universitat Jaume I.

5.4.1. Citotoxicidad

En la tabla 5.2 se indican los valores de IC_{50} de los compuestos **V.1-V.7** sobre las líneas tumorales HT-29, MCF-7 y sobre la no tumoral HEK-293. Los valores se midieron mediante ensayo con MTT después de 48 h de incubación. En la tabla también se indican los coeficientes α y β , obtenidos al dividir los valores de IC_{50} de la línea no tumoral HEK-293 entre los valores de IC_{50} de las líneas tumorales HT-29 y MCF-7, respectivamente.

Tabla 5.2. Valores de IC_{50} (μ M) a 48 h y coeficientes α y β de los compuestos **V.1-V.7**

Compuesto	HT-29	MCF-7	HEK-293	α	β
V.1	2,3 \pm 1,0	21 \pm 3	53 \pm 3	23,04	2,52
V.2	>100	>100	>100	--	--
V.3	26 \pm 3	4,5 \pm 1,6	3,4 \pm 0,4	0,13	0,76
V.4	1,1 \pm 0,6	13 \pm 7	12,0 \pm 0,8	10,91	0,92
V.5	>100	>100	29 \pm 7	<0,29	<0,29
V.6	8,3 \pm 1,9	1,13 \pm 0,21	4,2 \pm 2,3	0,51	3,72
V.7	4,6 \pm 1,8	1,2 \pm 0,4	2,4 \pm 0,9	0,52	2

La mayoría de los compuestos presentan una citotoxicidad media-baja en el rango micromolar. Los compuestos **V.1** y **V.4** muestran las citotoxicidades más elevadas en la línea celular HT-29 (2,3 y 1,1 μM , respectivamente) y además presentan una relativamente baja toxicidad en la línea celular sana HEK-293, mostrando un amplio margen terapéutico, de acuerdo con los valores α (23 y 11, respectivamente). Sin embargo, los compuestos **V.6** y **V.7** no presentan buena selectividad frente a células HEK-293 (coeficiente α inferior a la unidad) a pesar de presentar una relativamente alta citotoxicidad en células HT-29 (8,3 y 4,6 μM , respectivamente).

Los compuestos **V.6** y **V.7** muestran las mayores citotoxicidades en la línea tumoral MCF-7 (1,13 y 1,2 μM , respectivamente) y un buen margen terapéutico frente a las células HEK-293, de acuerdo con los valores β (3,7 y 2, respectivamente). Por el contrario, el compuesto **V.3** presenta una relativamente alta citotoxicidad en células MCF-7 (4,5 μM) pero no muestra selectividad frente a células HEK-293, ya que su coeficiente β es inferior a la unidad.

En la figura 5.3 se han representado gráficamente los valores de β frente a α . En el cuadrante superior derecha se encuentra el compuesto **V.1**, que muestra valores relativamente altos de los coeficientes α y β , es decir, muestra márgenes terapéuticos elevados en ambas líneas de células tumorales.

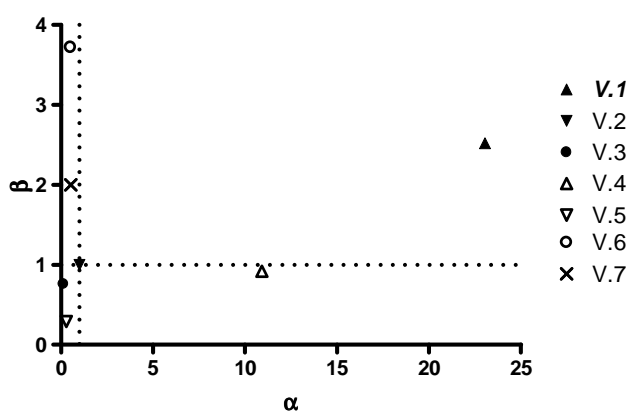


Figura 5.3. Representación de coeficientes β frente α para los compuestos **V.1-V.7**.

Los valores de IC_{50} obtenidos sobre células BAEC, medidos también mediante ensayo con MTT después de 48 h de incubación, se muestran en tabla 5.3. En esta

tabla también se muestran los coeficientes γ y δ , valores que se obtienen al dividir el valor de IC_{50} de la línea no tumoral BAEC entre los valores de IC_{50} de las líneas tumorales HT-29 y MCF-7, respectivamente.

Tabla 5.3. Valores de IC_{50} (μM) a 48 h y coeficientes γ y δ de los compuestos **V.1-V.7**

Compuesto	HT-29	MCF-7	BAEC	γ	δ
V.1	$2,3 \pm 1,0$	21 ± 3	76 ± 9	33	3,62
V.2	>100	>100	>100	--	--
V.3	26 ± 3	$4,5 \pm 1,6$	20 ± 4	0,77	4,44
V.4	$1,1 \pm 0,6$	13 ± 7	25 ± 4	22,7	1,92
V.5	>100	>100	86 ± 10	<0,86	<0,86
V.6	$8,3 \pm 1,9$	$1,13 \pm 0,21$	$2,4 \pm 0,5$	0,29	2,12
V.7	$4,6 \pm 1,8$	$1,2 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,5$	0,48	1,83

De la observación de los valores γ , se puede concluir que los compuestos **V.1** y **V.4** combinan valores relativamente altos de citotoxicidad y buenos márgenes terapéuticos en la línea tumoral HT-29 frente a células BAEC (33 y 22,7, respectivamente).

Los compuestos que muestran mayores valores δ son **V.1**, **V.3**, **V.4**, **V.6** y **V.7** ya que combinan valores relativamente altos de citotoxicidad y buenos márgenes terapéuticos en la línea tumoral MCF-7 frente a células BAEC (3,62, 4,44, 1,92, 2,12 y 1,83, respectivamente).

En la figura 5.4 se han representado gráficamente los valores de δ frente a los valores de γ . En el cuadrante superior derecha se encuentran los compuestos **V.1** y **V.4**, que exhiben simultáneamente valores relativamente altos de los coeficientes γ y δ .

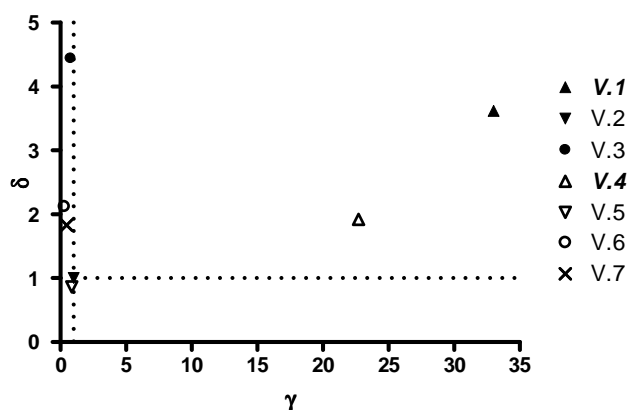


Figura 5.4. Representación de coeficientes δ frente γ para los compuestos **V.1-V.7**.

5.4.2. Estudio de la inhibición de la proliferación celular

Para realizar los ensayos de proliferación celular se trabajó únicamente con células HT-29, por lo que se decidió no investigar los compuestos **V.2** y **V.5** por no ser citotóxicos frente a este tipo de células. Las concentraciones de trabajo se indican en la tabla 5.4 y son siempre inferiores al valor de IC_{50} mostrado por cada compuesto sobre células HT-29.

Tabla 5.4. Concentraciones de trabajo

Compuesto	Concentración (μM)
V.1	1
V.3	20
V.4	1
V.6	5
V.7	1

Las células HT-29 se incubaron junto con los compuestos durante 48 y 72 horas a las concentraciones mostradas en la tabla 5.4. Transcurrido dicho tiempo, se recogieron las células y se contó el número de células vivas que había en cada uno de los pocillos utilizando una cámara de Neubauer y se normalizaron los valores respecto a una muestra de células tratadas con DMSO. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.5 y ponen de manifiesto que las concentraciones elegidas para realizar

los ensayos permiten la proliferación celular superior al 50% en todos los casos, tanto a 48 h como a 72 h.

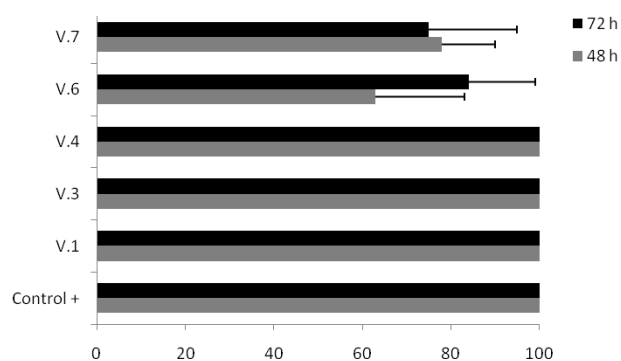


Figura 5.5. Proliferación celular sobre células HT-29.

5.4.3. Inhibición de la secreción de la proteína VEGF en células HT-29

La medición de la cantidad de proteína VEGF secretada por las células HT-29, después de 72 horas de incubación en presencia de los compuestos en las concentraciones indicadas en la tabla 5.4, se llevó a cabo con el método ELISA. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a un control positivo de células tratadas con DMSO y se muestran en la figura 5.6.

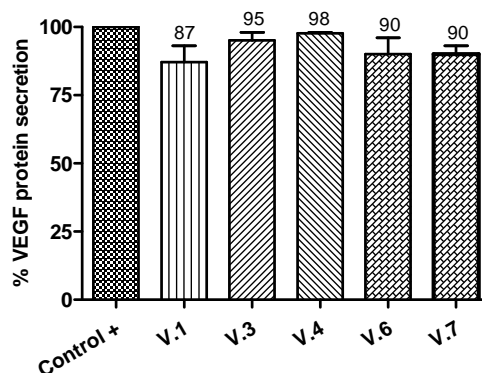


Figura 5.6. Porcentaje de secreción de la proteína VEGF en células HT-29.

Los resultados indicados en la tabla 5.6 ponen de manifiesto que los compuestos apenas inhiben la secreción de la proteína VEGF.

5.4.4. Inhibición de la expresión génica de *VEGF* en células HT-29

La inhibición de la expresión del gen *VEGF* se midió con la técnica qPCR, después de incubar las células HT-29 durante 48 h en presencia de los compuestos en las concentraciones indicadas en la tabla 5.4. El gen β -actina se utilizó como control endógeno y los valores obtenidos en el ensayo se normalizaron respecto a una muestra de células tratadas con DMSO. En la figura 5.7 se muestra el porcentaje de expresión del gen *VEGF* para los diferentes compuestos ensayados.

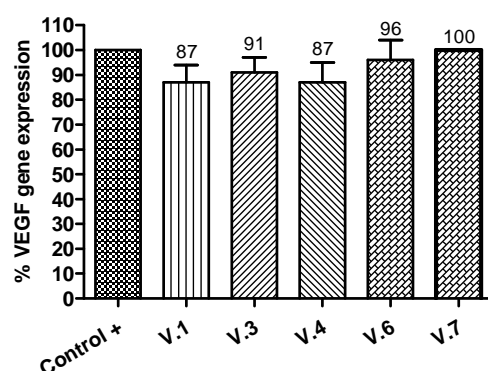


Figura 5.7. Porcentaje de expresión del gen *VEGF* en células HT-29.

El análisis de los resultados muestra que los compuestos presentan poca actividad inhibitoria frente al gen *VEGF*, hecho que se correlaciona con su poca capacidad de inhibición de la secreción de la proteína VEGF.

La prácticamente nula capacidad de inhibición de la secreción de VEGF y de la expresión del gen asociado concordaría con el diseño de estos compuestos, pues, como ya se ha comentado anteriormente, sus estructuras fueron diseñadas para conseguir la inhibición de sirtuinas, que muestran relación con hTERT (telomerasa) pero no con VEGF (angiogénesis).

5.4.5. Inhibición de la expresión génica de *hTERT* en células HT-29

La medición de la inhibición del gen *hTERT* se llevó a cabo con la técnica qPCR, después de incubar las células HT-29 durante 48 h en presencia de los compuestos en las concentraciones indicadas en la tabla 5.4 y aplicando el mismo procedimiento experimental empleado en la medición de la expresión del gen *VEGF* (β -actina como gen endógeno y DMSO como muestra de referencia). En la figura 5.8 se muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

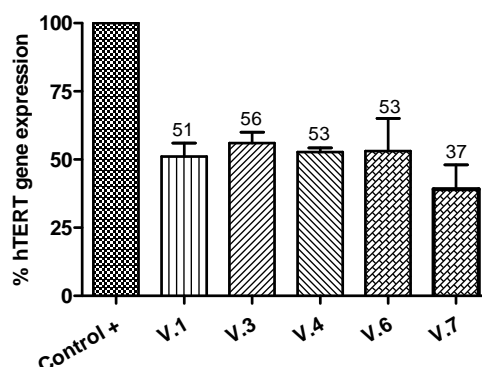


Figura 5.8. Porcentaje de expresión del gen *hTERT* en células HT-29.

El análisis de los resultados muestra que los compuestos **V.1**, **V.3**, **V.4** y **V.6** son capaces de inhibir la expresión del gen *hTERT* en porcentajes que van desde el 44% (compuesto **V.3**) al 63% (compuesto **V.7**).

5.4.6. Inhibición de la expresión génica de *c-Myc* en células HT-29

La medición de la inhibición del gen *c-Myc* se llevó a cabo con la técnica qPCR, después de incubar las células HT-29 durante 48 h en presencia de los compuestos en las concentraciones indicadas en la tabla 5.4 y aplicando el mismo procedimiento experimental empleado en la medición de la expresión de los genes *VEGF* y *hTERT* (β -actina como gen endógeno y DMSO como muestra de referencia). En la figura 5.9 se muestran los resultados obtenidos.

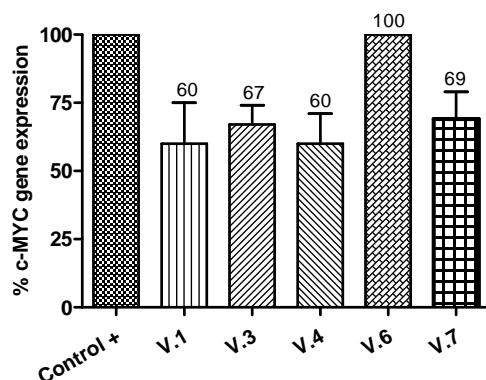


Figura 5.9. Porcentaje de expresión del gen *c-Myc* en células HT-29.

Todos los compuestos, a excepción del compuesto **V.6** que no presenta ninguna actividad, son capaces de inhibir alrededor del 30-40% la expresión del gen *c-Myc*.

En la figura 5.10 se ha representado gráficamente el porcentaje de expresión del gen *c-Myc* frente al porcentaje de expresión del gen *hTERT*.

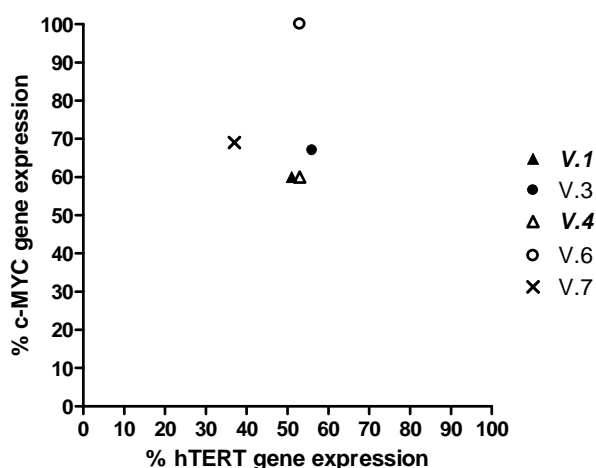


Figura 5.10. Valores de expresión del gen *c-Myc* frente al gen *hTERT*.

Los compuestos que quedan en la diagonal (**V.1**, **V.3** y **V.4**) muestran correlación entre la inhibición del gen *hTERT* y su gen regulador *c-Myc*, por lo que se podría pensar que estos compuestos ejercen su acción inhibitoria sobre el gen *hTERT*.

mediante inhibición del factor de transcripción *c-Myc*. El compuesto **V.7** reduce un 63% la expresión del gen *hTERT*, pero la inhibición del gen *c-Myc* solo es del 31%, por lo que muy probablemente la inhibición del gen *hTERT* podría ser causada por otros mecanismos que no implicarían al gen *c-Myc*.

5.5. Conclusiones

Los compuestos **V.1** y **V.4** presentan citotoxicidad en el rango micromolar bajo hacia células HT-29 y una buena selectividad frente a las células no tumorales HEK-293 y BAEC, de acuerdo con los coeficientes α y γ .

Los compuestos **V.6** y **V.7** presentan citotoxicidad en el rango micromolar bajo hacia células MCF-7 y buena selectividad frente a las células no tumorales HEK-293 y BAEC, de acuerdo con los coeficientes β y δ .

El compuesto **V.1** presenta toxicidad selectiva hacia las células tumorales HT-29 y MCF-7 tanto en células HEK-293 como en células BAEC, de acuerdo con los coeficientes α , β , γ y δ .

Los compuestos estudiados biológicamente, **V.1**, **V.3**, **V.4**, **V.6** y **V.7**, no exhiben acción inhibitoria de la secreción de la proteína VEGF ni de la expresión de su gen asociado.

Todos los compuestos analizados son capaces de inhibir alrededor del 50% la expresión del gen *hTERT*.

Los compuestos **V.1** y **V.4** reducen la expresión del gen *c-Myc* un 40% aproximadamente, mientras que los compuestos **V.3** y **V.7** lo reducen alrededor de un 30%.

Posiblemente, los compuestos **V.1**, **V.3** y **V.4** reducen la expresión del gen *hTERT* a través de la regulación en la expresión del gen *c-Myc*.

5.6. Experimental

5.6.1. Procedimientos sintéticos

Síntesis de 4-(5-formilfuran-2-il)-2-hidroxibenzoato de metilo **V.10**

A una disolución de 2-hidroxi-4-yodobenzoato de metilo **V.8** (0.516 g, 1.8 mmol) y ácido (5-formilfuran-2-il)borónico **V.9** (0.327 g, 2.34 mmol) en una mezcla de DMF (10 mL) y etanol (15 mL) se le añadió, bajo atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente, Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.129 g, 0.18 mmol) y una disolución acuosa de Na₂CO₃ 2 M (5.4 mL, 10.8 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido dicho tiempo, se añadió AcOEt (10 mL) y luego HCl 1 M, y se dejó agitando durante 5 min hasta la aparición de dos fases claramente diferenciadas. La fase orgánica se lavó con salmuera (x3) y agua (x3) y luego se secó sobre Na₂SO₄. Después de evaporar el disolvente bajo presión reducida, el residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice con Hexano/AcOEt (8:2) proporcionando 385.6 mg del compuesto **V.10** (87%).

Síntesis del ácido 4-(5-formilfuran-2-il)-2-hidroxibenzoico **V.11**

Una disolución del éster **V.10** (0.246 g, 1 mmol) en una mezcla de THF/MeOH (16 mL, 1:1) se calentó a 60°C y se añadió, lentamente, una disolución de NaOH 2 M (2.5 mL, 5 mmol). La mezcla resultante se calentó bajo reflujo durante 2 h. Transcurrido dicho tiempo, la mezcla de reacción se enfrió y se extrajo con éter (x3). La acidificación de la fase acuosa con HCl provocó la precipitación del ácido **V.11**, que se filtró y se lavó secuencialmente con etanol y hexano, lo que proporcionó 299.9 mg del ácido **V.11** (99%).

Síntesis de las tiazolidinonas **V.1-V.4**

Una disolución del aldehído **V.11** (0.046 g, 0.2 mmol), la rodanina **V.12** (0.027 g, 0.2 mmol) y la correspondiente amina (0.6 mmol) en etanol (1 mL) se irradió con microondas (300 W) a una temperatura de 150°C durante 20 min. Seguidamente, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió HCl 1 M hasta la completa precipitación del producto crudo. El precipitado se filtró y se lavó secuencialmente con agua, etanol y hexano, dando lugar al producto de interés sintético. Rendimientos: **V.1** (49%); **V.2** (39%); **V.3** (80%); **V.4** (54%).

Síntesis de la 5-alkilidentioxotiazolidinona **V.5**

Una disolución de bis(carboximetil)tritiocarbonato **V.13** (0.045 g, 0.2 mmol), 2-(3,4-diclorofenil)etanamina **V.14** (0.038 g, 0.2 mmol) y trietilamina (0.03 mL, 0.2 mmol) en DME (1 mL) se irradió con microondas (300 W) a una temperatura de 90°C durante 10 min. Luego se añadió el ácido **V.11** (0.046 g, 0.2 mmol) y la mezcla resultante se calentó bajo radiación con microondas (300 W) durante 5 min a 110°C. A continuación, se evaporó el DME bajo presión reducida y el residuo resultante se diluyó con metanol y se añadió HCl 2 M hasta la precipitación del producto crudo. El precipitado se filtró y se lavó secuencialmente con agua, etanol y hexano, lo que permitió la obtención de 30.2 mg la furilidentioxotiazolidinona **V.5** (29%).

Síntesis del arilcarbaldehído **V.17**

Este compuesto se obtuvo mediante reacción de Suzuki entre el 1-cloro-2-yodo-4-(trifluorometil)benceno **V.16** (0.552 g, 1.8 mmol) y el ácido (5-formilfuran-2-il)borónico **V.9** (0.327 g, 2.34 mmol) bajo las mismas condiciones experimentales empleadas en la obtención del éster **V.10**: DMF (10 mL), EtOH (15 mL), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.129 g, 0.18 mmol), Na₂CO₃ 2 M (5.4 mL, 10.8 mmol), t.a., 1 h. La purificación sobre gel de sílice con Hexano/AcOEt (9:1) proporcionó 316.4 mg del compuesto **V.17** (64%).

Síntesis de las tioxotiazolidinonas **V.6-V.7**

Estos compuestos se obtuvieron mediante reacción del carbaldehído **V.17** (0.055 g, 0.2 mmol) con bis(carboximetil)tritiocarbonato **V.13** (0.045 g, 0.2 mmol) y la amina apropiada **V.18** (0.2 mmol) y bajo las mismas condiciones experimentales empleadas en la preparación de la tioxotiazolidinona **V.5** (a) **V.13**, **V.18**, DME (1 mL), 90°C (300 W) 10 min; (b) **V.17**, 110°C (300 W), 5 min. Rendimientos: **V.6** (18%); **V.7** (54%).

5.6.2. Ensayos biológicos

Citotoxicidad

Las diferentes líneas celulares (5 x 10³ células) se incubaron en sus respectivos medios de cultivo junto con diluciones seriadas de los compuestos en un volumen total de 100 µL. La incubación, en placas de 96 pocillos, se llevó a cabo durante 48 horas a 37°C bajo atmosfera húmeda y 5% de CO₂. Transcurrido dicho tiempo se añadieron, a cada pocillo, 10 µL de MTT (5 mg/mL en PBS) y se incubó la microplaca

durante 3 horas más (37°C bajo atmosfera húmeda en 5% CO₂). Luego se eliminó el medio acuoso por decantación y el formazán generado se disolvió con 100 µL de DMSO. La microplaca fue leída a 550 nm con un lector de microplacas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los datos de absorbancia obtenidos fueron tratados con el programa *GraphPad Prism 4* dando lugar al valor indicado de IC₅₀.

Ensayos de proliferación celular

Las células HT-29 (100.000) fueron incubadas junto con los diferentes compuestos disueltos en DMSO durante 48 o 72 h en placas de 6 pocillos. Transcurrido dicho tiempo, las células se recogieron y se determinó el número de células vivas que había en cada uno de los pocillos utilizando azul de tripano para realizar el conteo celular mediante el uso de una cámara de Neubauer. El número de células vivas se normalizó respecto a un control positivo de DMSO. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Ensayos ELISA

Las células HT-29 (100.000) fueron incubadas junto con los diferentes compuestos disueltos en DMSO durante 72 h en placas de 6 pocillos. Transcurrido dicho tiempo, se recogió el medio de cultivo y el VEGF secretado por las células fue determinado utilizando un kit ELISA. Los datos de absorbancia se normalizaron respecto a un control positivo de DMSO que se utilizó como referencia. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Ensayos de qPCR

Las células HT-29 (100.000) fueron incubadas junto con los diferentes compuestos disueltos en DMSO a las concentraciones de trabajo durante 48 h en placas de 6 pocillos. Transcurrido dicho tiempo, las células se recogieron, se aisló el ARN, se retrotranscribió a ADN y finalmente se amplificaron los genes de interés usando la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real con sondas TaqMan, empleando la *β-actina* como control endógeno. Todos los experimentos fueron realizados usando un control positivo de DMSO como referencia. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

CHAPTER 6

SUMMARY

CHAPTER 6. SUMMARY

6.1. Introduction

Medicinal chemistry is an interdisciplinary science that combines organic chemistry, biochemistry, physical and computational chemistry, pharmacology and molecular biology, among others. Its purpose is the design, synthesis and chemical and biological study of new molecules with potential pharmacological and therapeutic activities.

Nowadays, cancer is the leading cause of death in developed countries. For that reason, the discovery of new drugs and biological targets against cancer has an important role in medicinal chemistry.

Cancer refers in broad terms a large number of diseases characterized by the development of abnormal cells that divide uncontrollably and have the ability to infiltrate and destroy normal body tissues. Cancer also has the capacity to spread throughout the body from its initial point of origin.³⁹⁸ In order to minimize side effects, efficient anticancer drugs should act on proteins not present in normal cells or present only in low concentrations.³⁹⁹

In the year 2000, a seminal paper authored by Robert Weinberg and Douglas Hanahan entitled *The Hallmarks of Cancer* was published in the journal *Cell*.⁴⁰⁰ In that publication, these scientists proposed six underlying properties shared by all types of cancer. In 2011, the same authors published an update of their initial paper in which they added four more properties.⁴⁰¹ These ten properties are:

- 1) Growth factor downregulation leading to growth self-stimulation.
- 2) Growth stop signals resistance.
- 3) Apoptosis resistance.
- 4) Angiogenesis induction.
- 5) Unlimited replicative capacity.
- 6) Surrounding tissues invasion and metastasis.
- 7) Metabolism downregulation.

³⁹⁸ (a) Boyle, F. T.; Costello, G. F. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 251-261. (b) Gibbs, J. B. *Science* **2000**, 287, 1969-1973.

³⁹⁹ Drahl, C.; Cravatt, B. F.; Sorensen, E. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5788-5809.

⁴⁰⁰ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, 100, 57-70.

⁴⁰¹ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, 144, 646-674.

- 8) Immune system evasion.
- 9) DNA instability caused by chromosomal alterations.
- 10) Local chronic inflammations.

6.1.1. Protooncogenes

Genes implicated in uncontrolled cell proliferation are called oncogenes. These oncogenes are derived in turn from normal genes responsible for the growth and development, called protooncogenes. When protooncogenes are activated, normal cell development is altered and cells are converted into tumor cells.⁴⁰² *Myc* protooncogenes are a family of genes present in normal cells that encode cell nucleus proteins and regulate other genes that facilitate DNA transcription. *c-Myc* is the most important gene related with this family of protooncogenes. It is implicated in embryogenesis processes, cell proliferation, cellular differentiation⁴⁰³ and apoptosis,⁴⁰⁴ and also participates in cell growth through the cell cycle.⁴⁰⁵ Downregulation of *c-Myc* expression can cause chromosomal translocations associated with some cancers, like prostate and colorectal cancers.

6.1.2. Telomeres and telomerase

Telomeres are non-coding nucleoprotein structures that constitute the ends of the chromosomes. Telomere length predicts cellular replicative capacity.⁴⁰⁶ Among their functions, telomeres are responsible for guarantee DNA integrity and stability, preventing chromosomal fusions and nuclease degradation.

Telomeres are constituted by tandem repetitions in a double helix and a final short non-coding single chain. In vertebrates, telomeres consist of a hexamer tandem repetition of nucleotides 5'-(TTAGGG)*n*-3' and of associated proteins. The actual number of repetition copies is species-related and fluctuates according to the life span of a cell. Human telomeres have approximately 500 to 2.000 copies, that is 3.000 to 12.000 pairs of bases. The terminal regions almost invariably consist of short direct repeats. These repeats usually contain cluster of 2-4 G residues and the strand that

⁴⁰² Hernández, M.; Ríos-Hernández, M. A. *Rev. Cubana Oncol.* **1999**, *15*, 131-139.

⁴⁰³ Hoffman, B.; Liebermann, D. A. *Oncogene* **2008**, *27*, 6462-6472.

⁴⁰⁴ Fumagalli, M.; Rosiello, F.; Clerici, M.; Barozzi, S.; Cittaro, D.; Kaplunov, J. M.; Bucci, G.; Dobrev, M.; Matti, V.; Beausejour, C. M.; Herbig, U.; Longhese, M. P.; di Fagagna, F. D. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 355-365.

⁴⁰⁵ Henriksson, M.; Luscher, B. *Advanc. Cancer Res.* **1996**, *68*, 109-182.

⁴⁰⁶ Blackburn, E. H. *Nature* **1991**, *350*, 569-573.

contains these clusters (the G strand) always forms the 3'-end of the chromosome. Telomere DNA together with associated proteins form cap structures which consist of a T-(telomere) and D-(displacement) loops which protect the ends of the telomeres. The T-loop is finished as a single-stranded 3'-overhanging segment which intercalates into double-stranded DNA and forms a D-loop. The function of this structure is probably related to the correct segregation of sister chromatids, regulation and expression of other genes.⁴⁰⁷

Telomerase is an enzyme that prevents aging by telomere elongation. When telomerase is active, telomere shortening does not occur and cell does not undergo apoptosis.⁴⁰⁸ Telomerase is a ribonucleoprotein complex whose core enzyme includes a reverse transcriptase unit, known as hTERT (human Telomeric End Reverse Transcriptase) and telomerase RNA, which contains a template site for DNA elongation and is known as hTR (human Telomerase RNA). Associated proteins (dyskerin, tankyrase, Hsp90, L22, p23, hStau) are also present.⁴⁰⁹

In almost all cells, hTERT transcriptional regulation represents the limiting step in telomerase process activation.⁴¹⁰

The actual telomerase reaction mechanism can be described in simplified terms as a three-step action. The short telomere sequence at the 3'-matrix end of the chromosome binds to the RNA telomerase domain in the first step. Elongation, which is a template-directed addition of nucleotides, occurs in the second step. Translocation, which enables repeated use of the same binding site, constitutes the last step.

The RNA template has 445 nucleotides with a repeated sequence consisting of 11 nucleotides 5'-(CUAACCCUAA)-3', which is complementary to the sequence of the telomere (TTAGGG).⁴¹¹ The actual binding domain consists of 5 nucleotides. The 3' terminal DNA telomere has the conformation of a T-loop during different cell phases. This structure loosens when a cell enters the S-phase thus enabling the replication of

⁴⁰⁷ McElligott, R.; Wellinger, R. J. *EMBO J.* **1997**, *16*, 3705-3714.

⁴⁰⁸ (a) Harley, C. B. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 167-177. (b) McCarthy, N. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 164-165.

⁴⁰⁹ Ebrahimnezhad, Z.; Zarghami, N.; Keyhani, M.; Amirsaadat, S.; Akbarzadeh, A.; Rahmat, M.; Taheri, Z. M.; Nejati-Koshki, K. *BioImpacts* **2013**, *3*, 67-74.

⁴¹⁰ (a) Takakura, M.; Kyo, S.; Kanaya, T.; Tanaka, M.; Inoue, M. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1558-1561. (b) Kyo, S.; Kanaya, T.; Takakura, M.; Tanaka, M.; Inoue, M. *Int. J. Cancer* **1999**, *80*, 60-63. (c) Cong, Y. S.; Wen, J.; Bacchetti, S. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 137-142. (d) Boldrini, L.; Faviana, P.; Gisfredi, S.; Zucconi, Y.; Di Quirico, D.; Donati, V. *Int. J. Oncol.* **2002**, *21*, 493-497.

⁴¹¹ Collins, K.; Mitchell, J. R. *Oncogene* **2002**, *21*, 564-579.

the 3'-terminal. The plasticity of telomeres together with the activity of associated proteins helps correct the formation and telomerase function.⁴¹²

Several studies have shown that some transcriptional factors participate in *hTERT* gene expression, such as *c-Myc* protooncogene which is able to activate telomerase inducing *hTERT* expression.^{413,414,415}

6.1.3. Angiogenesis

Blood vessels supply nutrients and oxygen to cells. Their action is essential in normal and tumor tissues growth. Angiogenesis is the process of developing new blood vessels. This process implicates the coordinate activity of vascular components, like endothelial cell division, basement membranes and extracellular matrix degradation, proliferation, migration and differentiation of endothelial cells, and new blood vessel maturation.^{416,417} Angiogenesis plays a crucial role in survival, progression, invasion and metastasis of tumor cells, and is therefore a good target against cancer.⁴¹⁸

VEGF proteins play a crucial role in tumor angiogenesis.^{419,420} VEGF expression is present in several cancers, such as colorectal, breast and lung cancers.^{421,422} VEGF proteins act on endothelial cells through tyrosine-kinase receptors (VEGFR), regulating cell functions as endothelial cell proliferation. VEGF protein family⁴²³ is formed by six glycoproteins called VEGF-A, VEGF-B,⁴²⁴ VEGF-C,⁴²⁵ VEGF-D,⁴²⁶ VEGF-E

⁴¹² Gavory, G.; Farrow, M.; Balasubramanian, S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4470-4480.

⁴¹³ Nakamura, T. M.; Morin, G. B.; Chapman, K. B.; Weinrich, S. L.; Andrews, W. H.; Lingner, J.; Harley, C. B.; Cech, T. R. *Science* **1997**, *277*, 955-959.

⁴¹⁴ Wang, J.; Xie, L. Y.; Allan, S.; Beach, D.; Hannon, G. J. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1769-1774.

⁴¹⁵ Wu, K.-J.; Grandori, C.; Amacker, M.; Simon-Vermot, N.; Polack, A.; Lingner, J.; Dalla-Favera, R. *Nature Genet.* **1999**, *21*, 220-224.

⁴¹⁶ Carmeliet, P. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 653-660.

⁴¹⁷ Hoff, P. M.; Machado, K. K. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38*, 825-833.

⁴¹⁸ Martinelli, E.; Troiani, T.; Morgillo, F.; Orditura, M.; De Vita, F.; Belli, G.; Ciardiello, F. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2013**, *18*, 25-37.

⁴¹⁹ Ferrara, N. *Semin. Oncol.* **2002**, *29*, 10-14.

⁴²⁰ Ferrara, N.; Gerber, H. P.; LeCouter, J. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 669-676.

⁴²¹ List, A. F. *Oncologist* **2001**, *6*, 24-31.

⁴²² Poon, R. T.-P.; Fan, S.-T.; Wong, J. J. *Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 1207-1225.

⁴²³ Cao, Y. *Sci. Signal.* **2009**, *2*, re1.

⁴²⁴ Olofsson, B.; Pajusola, K.; Kaipainen, A.; von Euler, G.; Koukov, V.; Saksela, O.; Orpana, A.; Petersson, R. F.; Alitalo, K.; Eriksson, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2576-2581.

and PlGF.⁴²⁷ From these, VEGF-A₁₆₅ is the predominant isoform. There are three receptor protein-tyrosine kinases for the VEGF family of ligands (VEGFR1, VEGFR2, and VEGFR3) and two non-enzymatic receptors (neuropilin-1 and -2). In addition, several of the VEGF family ligands bind to heparan sulphate proteoglycans that are found on the plasma membrane and in the extracellular matrix.⁴²⁸

VEGF is a mitogen and survival factor for vascular endothelial cells, and also promotes vascular endothelial cell and monocyte motility. Moreover, VEGF selectively and reversibly permeabilizes the endothelium without leading to injury. All of these properties are required for angiogenesis.⁴²⁹

6.1.4. Sirtuins

Histone deacetylases (HDACs) are enzymes that cleave off acetyl groups from acetyl-lysine residues in histone and other non-histone proteins. Four different classes of HDACs have been identified in humans so far. Although classes I, II, and IV are zinc-dependent amidohydrolases, class III HDACs, also termed sirtuins, depends on nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) for their catalytic activity. Sirtuins are involved in metabolism, stress responses and aging processes.^{430,431,432,433,434} Mammals present seven different isoforms (Sirt1-7), which differ in their intracellular location and in proteins that are able to deacetylate.^{207,208}

Sirtuins are considered attractive therapeutic agents because they are involved in diseases such as cancer, neurodegenerative disorders (Alzheimer disease, Parkinson and Huntington disease), diabetes and malnutrition, among others.^{207,208,209,210,211}

⁴²⁵ Joukov, V.; Pajusola, K.; Kaipainen, A.; Chilov, D.; Lahtinen, I.; Kukk, E.; Saksela, O.; Kalkkinen, N.; Alitalo, K. *EMBO J.* **1996**, *15*, 1751.

⁴²⁶ Orlandini, M.; Marconcini, L.; Ferruzzi, R.; Oliviero, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 11675-11680.

⁴²⁷ Maglione, D.; Guerriero, V.; Viglietto, G.; Dellibovi, P.; Persico, M. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9267-9271.

⁴²⁸ Roskoski Jr., K. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2007**, *62*, 179-213.

⁴²⁹ Connolly, D. T.; Heuvelman, D. M.; Nelson, R. et al. *J. Clin. Invest.* **1989**, *84*, 1470-1478.

⁴³⁰ Moniot, S.; Weyand, M.; Steegbom, C. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 1-5.

⁴³¹ Huber, K.; Superti-Fuga, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3616-3624.

⁴³² Shlicker, C.; Boanca, G.; Lkshminarasimhan, M.; Steegborn, C. *Aging* **2011**, *3*, 852-872.

⁴³³ Lawson, M.; Uciechowska, U.; Schemies, J.; Rumpf, T.; Jung, M.; Sippl, W. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1799*, 726-739.

⁴³⁴ Maurer, B.; Rumpf, T.; Scharfe, M.; Stolfa, D.; Schmitt, M.; He, W.; Verdin, E.; Sippl, W.; Jung, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1050-1053.

It is known that sirtuin 1 (Sirt1) expression promotes cell proliferation, decreases senescence and increases cell lifetime. Several studies have shown that Sirt1 inhibition blocks tumor cell proliferation and simultaneous Sirt1 and Sirt2 inhibition decreases tumor growth.^{207,208,209,210,211}

In addition, some studies have demonstrated that there is a correlation between sirtuin and telomerase activities because sirtuins are responsible for the regulation of some genes related with telomere activity, including *hTERT* and *c-Myc*. In fact, Sirt1 is involved in lifespan extension in mammals by *hTERT* transcription activation, via *c-Myc*. For that reason, compounds able to inhibit Sirt1 might also be able to inhibit telomerase.^{435,436}

Recent studies have shown that compounds with a thiobarbituric scaffold are able to inhibit some sirtuin isoforms.^{210,211} These results suggest the possibility that other related heterocycle-based structures could exhibit the same biological action. For that reason, it was thought that compounds with furylidenthiazolone and furylidenthioxothiazolidinone scaffolds could act against sirtuins and consequently, against telomerase.

6.1.5. Resveratrol

Several investigations have demonstrated that regular consumption of some kind of fruits and vegetables may decrease cancer risk. This beneficial effect is often associated with polyphenols present in food and plants,⁴³⁷ one of them being resveratrol (Fig. 6.1). Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) is a phytoalexine produced by an ample number of plants in response to infections caused by pathogenic microorganisms and stress responses.⁴³⁸ It is present in grapes, peanuts and berries and also in some drinks like wine⁴³⁹ and it has been associated with various beneficial properties.^{440,441}

⁴³⁵ Echeverri-Ruiz, N.; Mockus-Sivickas, I. *Rev. Fac. Med.* **2010**, *58*, 221-232.

⁴³⁶ Yamashita, S.; Ogawa, K.; Ikei, T.; Udono, M.; Fujiki, T.; Katakura, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *417*, 630-634.

⁴³⁷ Liu, B. L. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1833-1836.

⁴³⁸ Liu, Z.; Li, Y.; Yang, R. *Oncol. Lett.* **2012**, *4*, 837-839.

⁴³⁹ (a) Kraft, T. E.; Parisotto, D.; Schempp, C.; Efferth, T. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 782-799. (b) Das, D. K.; Mukherjee, S.; Ray, D. *Heart Failure Rev.* **2010**, *15*, 467-477.

⁴⁴⁰ Pervaiz, S.; Holme, A. L.; Aggarwal, B. B.; Anekonda, T. S.; Baur, J. A.; Gojkovic-Bukarica, L.; Della Ragione, F.; Kim, A. L.; Pirola, L.; Saiko, P. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 2851-2897.

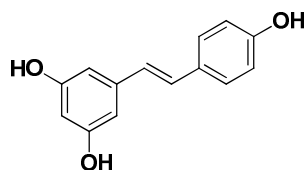


Figure 6.1. Structure of resveratrol.

Resveratrol is reputed to have a large number of pharmacological activities. Among the latter, chemopreventive,⁴⁴² antioxidant,⁴⁴³ antiinflammatory, antiaging,⁴⁴⁴ antiproliferative,⁴⁴⁵ cardioprotective,⁴⁴⁶ immunoregulatory,⁴⁴⁷ proapoptotic⁴⁴⁸ and antitumor action are worth mentioning.⁴⁴⁹ For that reason, resveratrol is believed to be useful in the control of atherosclerosis,⁴⁵⁰ hypertension,⁴⁵¹ cardiac pathologies,⁴⁵² arthritis,⁴⁵³ autoimmune diseases,⁴⁵⁴ diabetes,⁴⁵⁵ obesity,⁴⁵⁶ Alzheimer disease,⁴⁵⁷

⁴⁴¹ (a) Brisdelli, F.; D'Andrea, G.; Bozzi, A. *Curr. Drug Metab.* **2009**, *10*, 530-546. (b) Tyagi, S.; Singh, G.; Sharma, A.; Aggarwal, G. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2010**, *3*, 49-52. (c) Kroon, P. A.; Iyer, A.; Chunduri, P.; Chan, V.; Brown, L. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2442-2455.

⁴⁴² Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V. et al. *Science* **1997**, *275*, 218-220.

⁴⁴³ de la Lastra, C. A.; Villegas, I. *Biochem Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1156-1160.

⁴⁴⁴ de la Lastra, C. A.; Villegas, I. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 405-430.

⁴⁴⁵ Schneider, Y.; Vincent, F.; Duranton, B.; Badolosa, L.; Gosséa, F.; Bergmann, C.; Seilera, N.; Raula, F. *Cancer Lett.* **2000**, *158*, 85-91.

⁴⁴⁶ Wu, J. M.; Wang, Z.-R.; Hsieh, T.-C.; Bruder, J. L.; Zou, J.-G.; Huang, Y.-Z. *Int. J. Mol. Med.* **2001**, *8*, 3-17.

⁴⁴⁷ Gostner, J.; Ciardi, C.; Becker, K.; Fuchs, D.; Sucher, R. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 840-849.

⁴⁴⁸ Kloesch, B.; Dietersdorfer, E.; Loebisch, S.; Steiner, G. *Altern. Integr. Med.* **2014**, *3*:4.

⁴⁴⁹ Chem, M. C.; Lee, C. F.; Huang, W. H.; Chou, T. C. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1278-1287.

⁴⁵⁰ Fan, E.; Zhang, L.; Jiang, S.; Bai, Y. *J. Med. Food* **2008**, *11*, 610-614.

⁴⁵¹ Dolinsky, V. W.; Chakrabarti, S.; Pereira, T. J.; Oka, T. et al. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1832*, 1723-1733.

⁴⁵² Borriello, A.; Cucciolla, V.; Della Ragione, F.; Galletti, P. *Nutr. Metab. Cardiovas.* **2010**, *20*, 618-625.

⁴⁵³ Elmali, N.; Baysal, O.; Harma, A.; Esenkaya, I.; Mizrak, B. *Inflammation* **2007**, *30*, 1-6.

⁴⁵⁴ Harikumar, K. B.; Aggarwal, B. B. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1020-1035.

⁴⁵⁵ Poulsen, M. M.; Vestergaard, P. F.; Clasen, B. F.; Radko, Y. et al. *Diabetes* **2013**, *62*, 1186-1195.

⁴⁵⁶ Baek, S.-H.; Chung, H.-J.; Lee, H.-K.; Roshan D'Souza, R. et al. *Sci. Rep.* **2014**, DOI: 10.1038/srep03879.

⁴⁵⁷ Li, F.; Gong, Q.; Dong, H.; Shi, J. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 27-33.

Parkinson,⁴⁵⁸ aging processes⁴⁵⁹ and cancer.⁴⁶⁰ Indeed, resveratrol is considered one of the most interesting chemopreventive compounds.

Several studies have shown that resveratrol and some analogues exhibit antiangiogenic activities,^{461,462} and inhibit in a efficient way VEGF expression *in vitro*,⁴⁶³ as well as endothelial cell growth in BAEC⁴⁶⁴ and HUVEC cells.⁴⁶⁵

Resveratrol is pharmacologically safe as it shows selective cytotoxicity in tumor cells with low cytotoxicity in normal cells.⁴⁶⁶

Resveratrol is easily absorbed but its main problem lies in its low bioavailability (<1%).⁴⁶⁷ Resveratrol is rapidly metabolized in intestine and liver due to its high affinity for plasma proteins, and its is converted into soluble glucuronates and sulphates, which are rapidly excreted by urine and bile.⁴⁶⁸

Due to the structural simplicity of resveratrol, the synthesis of a reasonable number of non-natural derivatives related with it can be done in a fast and efficient way. This opens the possibility to create non-natural analogues with potentially enhanced pharmacological activity.

⁴⁵⁸ Ferretta, A.; Gaballo, A.; Tanzarella, P.; Piccoli, C. et al. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1842*, 902-915.

⁴⁵⁹ Park, S.-J.; Ahmad, F.; Philp, A.; Baar, K. et al. *Cell* **2012**, *148*, 421-433.

⁴⁶⁰ (a) Wu, J. M.; Tsieh, T. C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1215*, 16-21. (b) Richard, T.; Pawlus, A. D.; Iglésias, M. L.; Pedrot, E.; Waffo-Teguo, P.; Mérillon, J. M.; Monti J. P. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1215*, 103-108. (c) Smoliga, J. M.; Baur, J. A.; Hausenblas, H. A. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1129-1141. (d) Gaytri, A.; Rana, A. C.; Ramica, S. *Int. Res. J. Pharm.* **2012**, *3*, 56-60.

⁴⁶¹ (a) Brakenhielm, E.; Cao, R.; Cao, Y. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1798-1800. (b) Dachs, G. U.; Steele, A. J.; Coralli, C.; Kanthou, C.; Brooks, A. C.; Gunningham, S. P.; Currie, M. J.; Watson, A. I.; Robinson, B. A.; Tozer, G. M. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 280-290. (c) Durrant, D. E.; Richards, J.; Tripathi, A.; Kellogg, G. E.; Marchetti, P.; Eleopra, M.; Grisolia, G.; Simoni, D.; Lee, R. M. *Invest. New Drugs* **2009**, *27*, 41-52. (d) Athar, M.; Back, J. H.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Kim, A. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *486*, 95-102.

⁴⁶² Tseng, S. H.; Lin, S. M. et al. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 2190-2202.

⁴⁶³ Kimura, Y.; Sumiyoshi, M.; Baba, K. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 2083-2096.

⁴⁶⁴ Igura, K.; Ohta, T.; Kuroda, Y.; Kaji, K. *Cancer Lett.* **2001**, *171*, 11-16.

⁴⁶⁵ Kimura, Y.; Sumiyoshi, M.; Baba, K. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 2083-2096.

⁴⁶⁶ (a) Dörrie, J.; Gerauer, H.; Wachter, Y.; Zunino, S. J. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4731-4739. (b) Lee, S. K.; Zhang, W.; Sanderson, B. J. S. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7572-7577.

⁴⁶⁷ (a) Goldberg, D. M.; Yan, J.; Soleas, G. J. *Clin. Biochem.* **2003**, *36*, 79-87. (b) Wenzel, E.; Somoza, V. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 472-481.

⁴⁶⁸ Walle, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M. H.; Oatis, J. E. Jr.; Walle U. K. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 1377-1382.

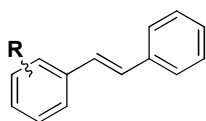
6.2. Aims and objectives

Taking into account the precedents explained above, this PhD thesis focuses on:

- 1) The synthesis of resveratrol analogues with potential antitumor activity.
- 2) The biological evaluation of resveratrol synthetic analogues focusing on:
 - 2.a) The evaluation of cytotoxic activity against two tumor cell lines (HT-29 and MCF-7) and two non-tumor cell lines (HEK-293 and BAEC).
 - 2.b) The investigation of tubulogenesis action on some selected compounds.
 - 2.c) The evaluation of the secretion of VEGF protein and its associated gene, which are intimately related to the process of angiogenesis.
 - 2.d) The evaluation of the expression of *hTERT* and *c-Myc* genes, which are related to the action of telomerase.
- 3) The synthesis of some compounds bearing furylidenthiazolone and furyldenthioxothiazolidinone scaffolds.
- 4) The biological evaluation of these compounds focusing on:
 - 4.a) The evaluation of cytotoxic activity against two tumor cell lines (HT-29 and MCF-7) and two non-tumor cell lines (HEK-293 and BAEC).
 - 4.b) The evaluation of the secretion of VEGF protein and its associated gene.
 - 4.c) The evaluation of the expression of *hTERT* and *c-Myc* genes.

6.3. Styrylphenols, methoxy(styryl)benzenes and allyloxy(styryl)benzenes

The synthesis of stilbene derivatives in which only one of the aromatic rings carried a functional group was initially addressed. The structures of the synthesized compounds are depicted in figure 6.2. These compounds were prepared upon Heck coupling reactions⁴⁶⁹ using two different methodologies, called A and B. Compounds **I.7-I.9**, which bear allyl groups, were obtained upon allylation reaction of the corresponding phenolic derivatives.



- I.1** R= 2-OH
I.2 R= 3-OH
I.3 R= 4-OH
I.4 R= 2-OCH₃
I.5 R= 3-OCH₃
I.6 R= 4-OCH₃
I.7 R= 2-OCH₂CH=CH₂
I.8 R= 3-OCH₂CH=CH₂
I.9 R= 4-OCH₂CH=CH₂

Figure 6.2. Structures of styrylphenols, methoxy(styryl)benzenes and allyloxy(styryl)benzenes.

Method A⁴⁷⁰: styrene (2 mmol), aryl bromide (1 mmol), Pd(0) (200 ppm), K₂CO₃ (3.7 mmol), TBAB (1 mmol), H₂O, 170°C (MW 70 W), 10 min.

Yields: **I.1** (63%), **I.2** (68%), **I.3** (26%), **I.4** (81%), **I.6** (88%).

Method B⁴⁷¹: styrene (1.5 mmol), aryl iodide (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.015 mmol), Bu₃N (2 mmol), TBAB (1 mmol), H₂O, 140°C, 24 h.

Yields: **I.1** (86%), **I.2** (65%), **I.3** (97%), **I.4** (65%), **I.5** (21% in 48 h), **I.6** (78%).

Allylation reaction⁴⁷²: hydroxystilbene (1 mmol), BrCH₂CH=CH₂ (3 mmol), K₂CO₃ (3 mmol) (or NaH, 3 mmol, for the preparation of *m*-allyloxystilbene), acetone, 65°C, 24 h.

Yields: **I.7** (79%), **I.8** (85%), **I.9** (90%).

⁴⁶⁹ Heck, R. F.; Nolley, Jr., J. P. *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 2320-2322.

⁴⁷⁰ Arvela, R. K.; Leadbeater, N. E. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1786-1790.

⁴⁷¹ (a) Jeffery, T. *Tetrahedron* **1996**, 52, 10113-10130. (b) Huan, S.; Chen, J.-R.; Tsai, F.-Y. *Molecules* **2010**, 15, 315-330.

⁴⁷² Gardner, R.; Kinkade, R.; Wang, C.; Phanstiel, O. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 3530-3537.

The cytotoxicity of resveratrol and compounds **I.1-I.9** (except **I.5** and **I.8**) was assessed in HT-29 (colorectal adenocarcinoma cells) and BAEC (bovine aortic endothelial cells) cell lines. Compounds were dissolved in DMSO, added to cells, left to incubate for 48 h and submitted to MTT assays (see table 4.1 for IC₅₀ values and α coefficients). Compounds **I.3**, **I.6** y **I.9** (bearing a substituent at the *para* position) show the highest cytotoxicities in HT-29 cell line (6.8, 5.5 and 5.4 $\mu\text{g/mL}$, respectively) and are more cytotoxic than resveratrol (25 $\mu\text{g/mL}$). Compounds **I.4**, **I.6**, **I.7** y **I.9** show the lowest cytotoxicities in BAEC cells (32, 88, 74 and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively), and show better therapeutic margins than resveratrol (IC₅₀ in BAEC 11 $\mu\text{g/mL}$).

Tubulogenesis or tube formation assay was carried out in BAEC cells. These cells were incubated on Matrigel in the presence of each compound for 7 h. Several concentrations for a same compound were tested to select the minimal concentration required to disrupt tube formation (MIC). After 7 h, cultures were photographed (see table 4.2 for MIC values). The analysis of the results point out that compounds **I.1**, **I.2**, **I.3**, **I.4**, **I.7** and **I.9** are able to inhibit tube formation in BAEC cells at non toxic concentrations (6.3, 6.3, 6.3, 12.5, 12.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$, respectively), whereas 12.5 $\mu\text{g/mL}$ of resveratrol were needed to disrupt tube formation. Compounds **I.1** and **I.2**, both carrying a hydroxyl group, show particularly interesting results because they are able to disrupt tube formation at low and non toxic concentrations.

ELISA test was used to measure the ability of synthetic compounds to inhibit VEGF protein secretion in HT-29 cells. According to tubulogenesis test results, compounds **I.1**, **I.4** and **I.7** were selected for the ELISA test. Thus, HT-29 cells were cultured for 72 h in the presence of these compounds and resveratrol at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ in DMSO. Supernatants were collected and the protein VEGF present in the medium was evaluated following the ELISA protocol. Results were compared with cells treated only with DMSO (see figure 4.2). Compounds **I.1** and **I.7** inhibit VEGF protein secretion around 60%, showing thus better inhibitory ability than resveratrol, which only inhibits 35% of protein secretion.

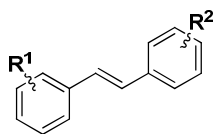
VEGF gene expression was measured by PCR analysis using the traditional technique. Thus, HT-29 cells were cultured for 48 h in the presence of compounds **I.1**, **I.4** and **I.7** and resveratrol at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ in DMSO. Then, RNA was extracted, retrotranscribed to DNA and the *VEGF* gene was amplified. Agarose gel electrophoresis was performed using ethidium bromide as intercalating agent. Results were compared with a sample of cells treated with DMSO, and β -actin was used as an endogenous control gene (see figure 4.3). Compound **I.7** showed the

highest inhibition (50%) being more active than resveratrol, that inhibits *VEGF* gene expression by 14%.

In conclusion, compound **I.7** is the most active compound against angiogenesis target, because it shows good cytotoxic selectivity and is able to inhibit tube formation at low concentration (12.5 $\mu\text{g/mL}$) in BAEC cells. Furthermore, it is able to inhibit VEGF protein secretion by 57% and *VEGF* gene expression by 50%, showing therefore better values than resveratrol.

6.4. (Hydroxystyryl)phenols, (methoxystyryl)phenols, styryl-anilines and *N*-acystyrylanilines

In order to acquire a better knowledge about the influence of some functional groups in the biological activity of resveratrol related compounds, a number of stilbene derivatives were synthesized (see figure 6.3).



I.10 R ¹ = 2-OH, R ² = 2-OH	I.25 R ¹ = 2-NH ₂ , R ² = H	I.40 R ¹ = 4-NH ₂ , R ² = 2-OH
I.11 R ¹ = 2-OH, R ² = 3-OH	I.26 R ¹ = 3-NH ₂ , R ² = H	I.41 R ¹ = 4-NH ₂ , R ² = 3-OH
I.12 R ¹ = 2-OH, R ² = 4-OH	I.27 R ¹ = 4-NH ₂ , R ² = H	I.42 R ¹ = 4-NH ₂ , R ² = 4-OH
I.13 R ¹ = 2-OH, R ² = 2-OCH ₃	I.28 R ¹ = 2-NH ₂ , R ² = 2-OH	I.43 R ¹ = 4-NH ₂ , R ² = 2-OCH ₃
I.14 R ¹ = 2-OH, R ² = 3-OCH ₃	I.29 R ¹ = 2-NH ₂ , R ² = 3-OH	I.44 R ¹ = 4-NH ₂ , R ² = 3-OCH ₃
I.15 R ¹ = 2-OH, R ² = 4-OCH ₃	I.30 R ¹ = 2-NH ₂ , R ² = 4-OH	I.45 R ¹ = 4-NH ₂ , R ² = 4-OCH ₃
I.16 R ¹ = 3-OH, R ² = 3-OH	I.31 R ¹ = 2-NH ₂ , R ² = 2-OCH ₃	I.46 R ¹ = NHCO(CH ₂) ₁₀ CH ₃ , R ² = H
I.17 R ¹ = 3-OH, R ² = 4-OH	I.32 R ¹ = 2-NH ₂ , R ² = 3-OCH ₃	I.47 R ¹ = NHCO(CH ₂) ₁₀ CH ₃ , R ² = H
I.18 R ¹ = 3-OH, R ² = 2-OCH ₃	I.33 R ¹ = 2-NH ₂ , R ² = 4-OCH ₃	I.48 R ¹ = NHCO(CH ₂) ₁₀ CH ₃ , R ² = H
I.19 R ¹ = 3-OH, R ² = 3-OCH ₃	I.34 R ¹ = 3-NH ₂ , R ² = 2-OH	
I.20 R ¹ = 3-OH, R ² = 4-OCH ₃	I.35 R ¹ = 3-NH ₂ , R ² = 3-OH	
I.21 R ¹ = 4-OH, R ² = 4-OH	I.36 R ¹ = 3-NH ₂ , R ² = 4-OH	
I.22 R ¹ = 4-OH, R ² = 2-OCH ₃	I.37 R ¹ = 3-NH ₂ , R ² = 2-OCH ₃	
I.23 R ¹ = 4-OH, R ² = 3-OCH ₃	I.38 R ¹ = 3-NH ₂ , R ² = 3-OCH ₃	
I.24 R ¹ = 4-OH, R ² = 4-OCH ₃	I.39 R ¹ = 3-NH ₂ , R ² = 4-OCH ₃	

Figure 6.3. Structures of hydroxystyryl)phenols, (methoxystyryl)phenols, styrylanilines and *N*-acyl styrylanilines.

Compounds **I.10-I.24** bearing hydroxyl and methoxyl groups were synthesized using Heck coupling reactions under methodology C (see below). Aminated compounds **I.25-I.45** were synthesized using different Heck coupling methodologies (C, D, E and F, see below). In order to improve bioavailability, *N*-acylated derivatives

I.46-I.48 were synthesized. In these compounds, a twelve carbon alkyl chain was introduced in order to mimetize fatty acids and facilitate cell product penetration through the lipid bilayer. Compound **I.47** was synthesized upon amidation reaction of the amino derivative **I.26**, obtained in turn by means of the Heck coupling reaction. To get compounds **I.46** and **I.47**, a reversal in the order of reactions was required. Thus, the corresponding anilines were *N*-acylated and the acylated compounds were subjected to Heck coupling reactions with the corresponding bromophenyl derivatives.

Method C⁴⁷³: hydroxystyrene (1.5 mmol), aryl bromide (1 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0.03 mmol), piperidine (3.65 mmol), DMF, 180°C (MW 150 W), 3 h.

Yields: **I.10** (61%), **I.11** (62%), **I.12** (67%), **I.13** (56%), **I.14** (76%), **I.15** (52%), **I.16** (81%), **I.17** (88%), **I.18** (85%), **I.19** (11%), **I.20** (72%), **I.21** (64%), **I.22** (53%), **I.23** (62%), **I.24** (50%), **I.28** (64%), **I.29** (62%), **I.34** (70%), **I.36** (75%),

Method D⁴⁷¹: styrene (1 mmol), bromoaniline (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.01 mmol), Bu₃N (1.2 mmol), TBAB (1.2 mmol), H₂O, 140°C (MW 70 W), 1.5 h.

Yields: **I.35** (74%), **I.41** (68%),

Method E^{471,473}: styrene (1 mmol), bromoaniline (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.04 mmol), piperidine (1.5 mmol), DMF, 140°C (MW 70 W), 1.5 h.

Yields: **I.25** (75%), **I.26** (69%), **I.27** (68%), **I.30** (51%), **I.40** (39%), **I.42** (52%).

Method F⁴⁷⁴: styrene (1 mmol), bromoaniline (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.005 mmol), K₂CO₃ (2 mmol), DMF, 175°C (MW 25 W), 30 min.

Yields: **I.31** (72%), **I.32** (69%), **I.33** (59%), **I.37** (71%), **I.38** (73%), **I.39** (71%), **I.43** (74%), **I.44** (45%), **I.45** (55%).

Amidation reaction⁴⁷⁵: dodecanoic acid (1 mmol), Et₃N (1.05 mmol), ClSO₂NCO (1 mmol), CH₂Cl₂, 0°C, 3 h; followed by styrylaniline (2 mmol), r.t., 16 h.

Yields: **I.46** (33%), **I.47** (44%), **I.48** (36%).

⁴⁷³ Sharma, N.; Mohanakrishnan, D.; Shard, A.; Sharma, A.; Sinha, A. K.; Sahal, D. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 297-311.

⁴⁷⁴ Kormos, C. M.; Leadbeater, N. E. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3854-3858.

⁴⁷⁵ Keshavamurthy, K. S.; Vankar, Y. D.; Dhar, D. N. *Synthesis* **1982**, *6*, 506-508.

The cytotoxicity of compounds **I.10-I.48** as well as resveratrol was measured at 48 h on two tumor cell lines, HT-29 and MCF-7 (breast adenocarcinoma cells), and one non-tumor cell line, HEK-293 (human embryonic kidney cells) (see table 4.3 for IC₅₀ values and for α and β coefficients).

Compound **I.45** shows nanomolar activity in both tumor cell lines (3.6 and 2.1 ng/mL in HT-29 and MCF-7 cells, respectively) and a good therapeutic margin also in both tumor cell lines (3.3 and 5.7 in HT-29 and MCF-7 cells, respectively).

Compounds **I.27** and **I.46** show also relatively high cytotoxicities in HT-29 cell line (4.4 and 2.5 μ g/mL, respectively) and they also show good therapeutic margins (α values 2.6 and 6.4, respectively). Compound **I.17** shows a relatively high cytotoxicity in HT-29 cells (6.9 μ g/mL) but it is not selective for HEK-293 cells (α value 0.16).

Compounds **I.33**, **I.36**, **I.47** and **I.48** show relatively high cytotoxicities in MCF-7 cell line (0.4, 6, 3.5 and 5.8 μ g/mL, respectively) and good therapeutic margins (β values 1.4, 1.2, 3.3 and 1.7, respectively). Compounds **I.21**, **I.25**, **I.32**, **I.42** and **I.43** show relatively low IC₅₀ values (6.8, 1.4, 6.1, 2.2 and 3.2 μ g/mL, respectively) but they are not selective for HEK-293 cells (β values 0.2, 0.9, 0.1, 0.4 and 0.3, respectively).

A compound selection was made for the study of the antiangiogenic and antitelomerase activity. Under consideration of an adequate degree of both selectivity and cytotoxicity, compounds **I.15**, **I.18**, **I.19**, **I.20**, **I.22**, **I.25**, **I.26**, **I.27**, **I.32**, **I.34**, **I.35**, **I.37**, **I.38**, **I.39**, **I.44**, **I.45** and **I.46** were selected for the study.

To carry out the biological evaluation of the selected compounds 10 μ g/mL concentration were used for all compounds, including resveratrol. Compounds **I.27** and **I.46** were assayed at 2 μ g/mL to work with concentrations lower than their IC₅₀ values. Compound **I.45**, the most cytotoxic one, was tested in HT-29 cells at 1, 2 and 3 ng/mL concentrations and in MCF-7 cells at 1 and 2 ng/mL concentrations.

ELISA test was used to measure the ability to inhibit VEGF protein secretion in HT-29 cells after 72 hours of incubation in the presence of selected compounds and resveratrol at above mentioned concentrations. Results were compared with cells treated with DMSO (see figure 4.9). Compound **I.32** exhibits maximum inhibition (49%) and compound **I.25** inhibits VEGF protein secretion by 41%, both compounds showing thus better inhibition than resveratrol (22%).

Compound **I.45** inhibits VEGF protein secretion by 41% at 3 ng/mL in HT-29 cells. Its inhibition in MCF-7 cells reaches 25% at 2 ng/mL (see figure 4.10). The compound is therefore much more active than resveratrol, particularly if one takes into account

that resveratrol inhibition (22% in HT-29 cells) is achieved at 10 µg/mL. Thus, compound **I.45** is three orders of magnitude more active than resveratrol in the inhibition of VEGF production.

In order to determine whether compounds under study were able to control VEGF protein production at a transcriptional level, a real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis was performed related to *VEGF* gene. To carry out this study, HT-29 cells were incubated in the presence of selected compounds and resveratrol for 48 h at concentrations indicated above, with *β-actin* being used as endogenous gene. The results were compared with cells treated with DMSO. RNA was extracted from each sample, retrotranscribed to DNA and *VEGF* gene was amplified (see figure 4.12). Thus, several compounds showed a visibly stronger inhibitory effect on the transcription of VEGF mRNA than resveratrol, which inhibited *VEGF* gene expression by 35% of the control value. The reduction degrees were particularly strong for compounds **I.27** and **I.38**, which caused inhibition of the *VEGF* gene expression by 76 and 77%, respectively, of the control value. The results displayed in figures 4.9 and 4.12 do not show correlation between the VEGF amount excreted to the medium and the degree of gene expression. Compounds **I.27** and **I.38**, for instance, proved highly effective in the inhibition of the *VEGF* gene expression but much less so in decreasing the amount of VEGF secreted to the medium. This suggests that these compounds exert the control of VEGF production at a phase different from that of gene transcription, perhaps during the post-translational stage, during which the lighter isoforms such as VEGF-A₁₆₅ are formed and secreted to the medium.⁴⁷⁶

As in the previous case, a separate study was performed for compound **I.45**. The inhibition of the *VEGF* gene expression was measured in this case on both HT-29 and MCF-7 cancer cell lines (see figure 4.13). When HT-29 cells were incubated in the presence of 1, 2 or 3 ng/mL of compound **I.45**, the level of *VEGF* gene expression was similar to that achieved by resveratrol at a concentration of 10 µg/mL. In other words, the potency of compound **I.45** in downregulating *VEGF* gene expression is three orders of magnitude higher than that of resveratrol. In addition, when MCF-7 cells were treated with 2 ng/mL of compound **I.45**, only 36% of *VEGF* gene expression was detected. Thus, compound **I.45** is about 5.000 times more active than resveratrol.

Angiogenesis studies were pursued on BAEC cells with hydroxylated compounds **I.10-I.24**. Cells were incubated for 48 h in the presence of the above mentioned compounds and resveratrol. IC₅₀ values showed that the less cytotoxic ones were

⁴⁷⁶ Nakamura, M.; Abe, Y.; Tokunaga, T. *Pathol. Int.* **2002**, 52, 331-339.

compounds **I.15**, **I.18**, **I.19** and **I.20** (23, 20.9, 17.7 and 17.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively, see table 4.4), showing higher IC_{50} values than resveratrol (11.9 $\mu\text{g/mL}$). These compounds were selected to carry out *wound healing assay* on BAEC cells.

To proceed with this assay, BAEC cells were incubated in a plate until confluence. Then, a hurt was made with a pipette tip and medium was replaced to eliminate detached cells. In order to obtain the minimal concentration able to inhibit wound healing, BAEC cells were incubated for 24 h in the presence of the above mentioned compounds and resveratrol at different concentrations. Plates were photographed at 0, 18 and 24 h. In the positive control of DMSO, wound was healed after 18 h. In the resveratrol containing plate, wound was opened after 24 h at 15 $\mu\text{g/mL}$ concentration. With compound **I.20** wound was opened after 24 h at 10 $\mu\text{g/mL}$ concentration and in the case of compounds **I.15**, **I.18** and **I.19** only 5 $\mu\text{g/mL}$ were needed to preserve the wound opened after 24 h.

To evaluate *hTERT* gene expression, qPCR assays were performed on HT-29 cells at 48 h, using the same experimental procedure as in *VEGF* gene expression. As in previous experiments, the highly cytotoxic compound **I.45** was the subject of a separate study, which will be described below. Apart from compound **I.45**, the most active one is compound **I.32** that is able to inhibit *hTERT* gene expression by 65% (see figure 4.14). Compounds **I.18**, **I.19**, **I.20**, **I.34**, **I.37** and **I.46** downregulate *hTERT* gene expression around 50%. These seven compounds show somewhat higher activity than that of resveratrol (gene inhibition by 43%).

Inhibition of *hTERT* gene expression for compound **I.45** was measured on both HT-29 and MCF-7 cancer cell lines (see figure 4.15). Inhibition of *hTERT* gene raised to 52% of the control value at 3 ng/mL on HT-29 cells and to 49% when 2 ng/mL concentration was used on MCF-7 cells. Again, the potency of compound **I.45** in downregulating *hTERT* gene expression is 3.000-5.000 times greater than that of resveratrol.

To determine *c-Myc* gene expression, qPCR assays were performed on HT-29 cells at 48 h, using the same experimental procedure as in previous studies. Aside from compound **I.45**, the most active compounds are **I.34** and **I.38** that show inhibition figures around 65% (see figure 4.16). Compounds **I.20**, **I.27**, **I.37** and **I.46** show *c-Myc* gene inhibition around 54-55%. These six compounds show higher inhibition potency than resveratrol (49%).

Inhibition of *c-Myc* gene expression for compound **I.45** was again measured on both HT-29 and MCF-7 cancer cell lines (see figure 4.17) showing 31% inhibition on

HT-29 cells at 3 ng/mL and 70% inhibition on MCF-7 cells at 2 ng/mL, causing over 10% inhibition than resveratrol at a concentration 5.000 times lower.

In conclusion, compound **I.45** is the most active compound and shows an activity at nanomolar concentration. Compounds **I.20**, **I.34** and **I.46** show dual activity being able to efficiently inhibit *VEGF* and *hTERT* gene expressions. Compound **I.32** also shows dual activity and is able to inhibit in an efficient way *VEGF* protein secretion and *hTERT* gene expression.

6.5. Styrylpyridines and styrylpyrimidines

Another objective of this Thesis was the synthesis and the biological evaluation of styrylpyridines and styrylpyrimidines. The first set of such compounds to be prepared was that of 4-styrylpyridines whose structures are depicted in figure 6.4. As in the synthesis of the precedent compounds, these derivatives were obtained upon Heck coupling reactions⁴⁶⁹ using methods D and E (see below).

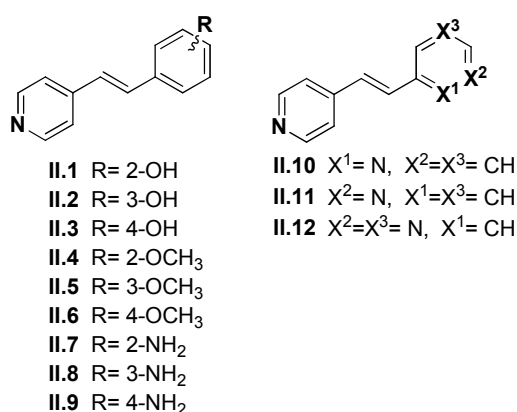


Figure 6.4. 4-styrylpyridines structure.

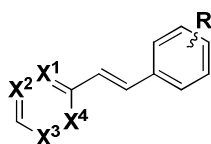
Method D⁴⁷¹: 4-vinylpyridine (1 mmol), aryl bromide (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.01 mmol), Bu₃N (1.2 mmol), TBAB (1.2 mmol), H₂O, 140°C (MW 70 W), 1.5 h.

Yields: **II.4** (80%), **II.5** (79%), **II.6** (78%).

Method E^{471,473}: 4-vinylpyridine (1 mmol), aryl bromide (1 mmol), Pd(NH₃)₂Cl₂ (0.04 mmol), piperidine (1.5 mmol), DMF, 140°C (MW 70 W), 1.5 h.

Yields: **II.1** (45%), **II.2** (47%), **II.3** (40%), **II.7** (71%), **II.8** (72%), **II.9** (61%), **II.10** (54%), **II.11** (64%), **II.12** (52%).

The other set of compounds to be synthesized and biologically evaluated was that of styrylpyrimidines whose structures are depicted in figure 6.5. All these compounds were obtained upon Heck coupling reactions⁴⁶⁹ using method D (see above).



II.13 $X^1 = N$, $X^2 = X^3 = X^4 = CH$, $R = 2-OCH_3$

II.14 $X^1 = N$, $X^2 = X^3 = X^4 = CH$, $R = 3-OCH_3$

II.15 $X^1 = N$, $X^2 = X^3 = X^4 = CH$, $R = 4-OCH_3$

II.16 $X^2 = N$, $X^1 = X^3 = X^4 = CH$, $R = 2-OCH_3$

II.17 $X^2 = N$, $X^1 = X^3 = X^4 = CH$, $R = 3-OCH_3$

II.18 $X^2 = N$, $X^1 = X^3 = X^4 = CH$, $R = 4-OCH_3$

II.19 $X^1 = X^4 = N$, $X^2 = X^3 = CH$, $R = 2-OCH_3$

II.20 $X^1 = X^4 = N$, $X^2 = X^3 = CH$, $R = 3-OCH_3$

II.21 $X^1 = X^4 = N$, $X^2 = X^3 = CH$, $R = 4-OCH_3$

II.22 $X^2 = X^3 = N$, $X^1 = X^4 = CH$, $R = 2-OCH_3$

II.23 $X^2 = X^3 = N$, $X^1 = X^4 = CH$, $R = 3-OCH_3$

II.24 $X^2 = X^3 = N$, $X^1 = X^4 = CH$, $R = 4-OCH_3$

Figure 6.5. Styrylpyrimidines structure.

Method D⁴⁷¹: vinylpyridine or vinylpyrimidine (1 mmol), aryl bromide (1 mmol), $Pd(NH_3)_2Cl_2$ (0.01 mmol), Bu_3N (1.2 mmol), TBAB (1.2 mmol), H_2O , $140^\circ C$ (MW 70 W), 1.5 h.

Yields: **II.13** (65%), **II.14** (67%), **II.15** (61%), **II.16** (78%), **II.17** (79%), **II.18** (82%), **II.19** (64%), **II.20** (60%), **II.21** (51%), **II.22** (62%), **II.23** (59%), **II.24** (60%).

The cytotoxic activity of compounds **II.1-II.24** and resveratrol was evaluated on HT-29 and MCF-7 tumor cell lines, as well as on one non-tumor cell line, HEK-293 (see tables 4.6 and 4.7 for IC_{50} values and for α and β coefficients).

Compound **II.5** is the most cytotoxic on HT-29 cells (9.2 $\mu g/mL$) followed by compounds **II.4**, **II.6** and **II.11** (16, 12.8 and 16 $\mu g/mL$, respectively). On MCF-7 cell line, compounds **II.3**, **II.9** and **II.13** show the highest cytotoxicities (3.2, 4.0 and 0.36 $\mu g/mL$, respectively).

Compounds **II.8**, **II.11** and **II.15** show good therapeutic margins in both tumor cell lines (relatively high α and β coefficients).

A selection of compounds was made for the study of VEGF secretion and VEGF, *hTERT* and *c-Myc* gen expression. Compounds **II.4**, **II.5**, **II.6**, **II.8**, **II.9**, **II.10**, **II.11**, **II.12**, **II.15**, **II.17** and **II.22** were selected taking into account both cytotoxicity and selectivity. A 10 $\mu g/mL$ concentration was used for all compounds, including

resveratrol, except for compound **II.5** that required 5 $\mu\text{g/mL}$ in order to work with a concentration value lower than its IC_{50} value.

ELISA test was used to measure the ability to inhibit VEGF protein secretion on HT-29 cells. For that purpose, cells were incubated in the presence of selected compounds, including resveratrol, at above mentioned concentrations for 72 h. Results were compared with a positive control of cells treated with DMSO (see figure 4.24). Compounds **II.4** and **II.6** show the highest capacity to inhibit VEGF protein secretion (63 and 58%, respectively), and were thus more active than resveratrol (22% inhibition). Compound **II.5** also shows relatively good VEGF protein secretion inhibition (48%).

Inhibition of *VEGF* gene expression on HT-29 cells was determined by means of the qPCR technique after 48 h of incubation in the presence of selected compounds and resveratrol at concentrations indicated above. *β -actin* was used as endogenous gene and results were compared with cells treated with DMSO (see figure 4.25). Compound **II.8** is the most active in its inhibitory ability on *VEGF* gene expression (52% inhibition), showing thus a greater activity than resveratrol (35% inhibition). In contrast, compound **II.8** does not show a high VEGF protein inhibitory ability. This suggests that the *VEGF* gene inhibition may be regulated at a non-transcriptional level.

To evaluate *hTERT* gene expression qPCR assays were performed in HT-29 cells at 48 h, using the same experimental procedure as in *VEGF* gene expression (see figure 4.26). Compounds **II.4** and **II.15** inhibit *hTERT* gene expression by 46 and 48%, respectively, which are slightly higher values than that shown by resveratrol (43% inhibition).

In order to determine *c-Myc* gene expression qPCR assays were performed in HT-29 cells at 48 h, using the same procedure as in previous studies (see figure 4.27). The most active compounds are **II.5**, **II.9** and **II.10**, which show inhibition values around 50%, close to the resveratrol value (49% inhibition).

In conclusion, **II.4-II.6** are the most active compounds within this group of methoxystyrylpyridines. In addition, compounds **II.4** and **II.17** show dual activity, and are able to efficiently inhibit both VEGF protein secretion and *hTERT* gene expression. Compound **II.5** inhibits in an efficient way VEGF protein secretion and *c-Myc* gene expression simultaneously.

4-(hydroxystyryl)pyridines (compounds **II.1-II.3**), 2-styrylpyrimidines (compounds **II.19-II.21**) and 5-styrylpyrimidines (compounds **II.22-II.24**) show no relevant biological activities.

6.6. Benzylidenanilines

The study of the biological activity of resveratrol related stilbenes was completed with the synthesis and biological evaluation of the imine compounds depicted in figure 6.6. They were obtained upon condensation between aldehydes and amines under three different reaction conditions, G, H and I.

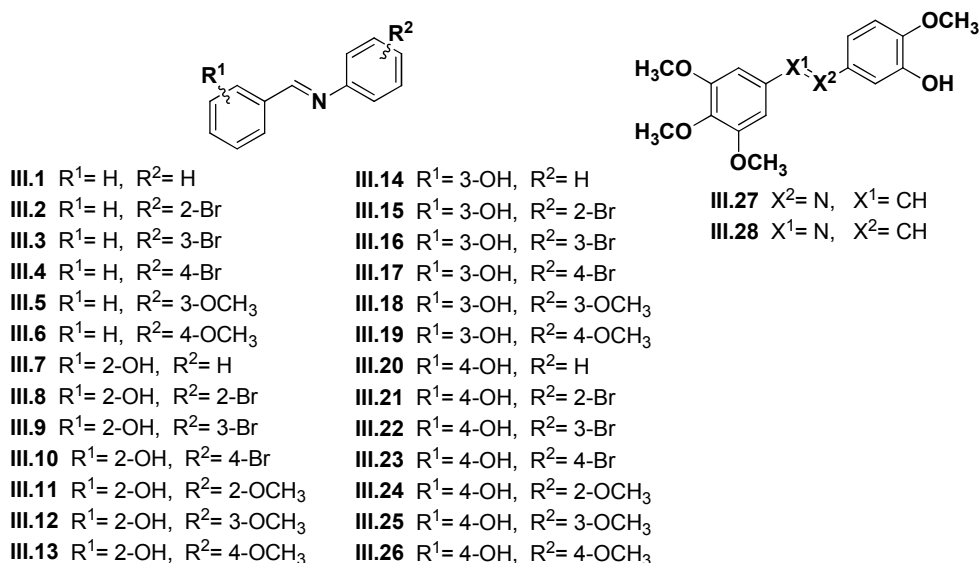


Figure 6.6. Imine resveratrol analogues structure.

Method G:⁴⁷⁷ aldehyde (1 mmol), amine (1 mmol), EtOH, r.t., 5 h.

Yields: **III.1** (99%), **III.3** (99%), **III.4** (99%), **III.6** (52%), **III.24** (39%), **III.27** (52%), **III.28** (42%).

Method H:⁴⁷⁸ aldehyde (1 mmol), amine (1 mmol), toluene, molecular sieves, r.t., 24 h.

⁴⁷⁷ Tripodi, F.; Pagliarin, R.; Fumagalli, G.; Bigi, A.; Fusi, P.; Orsini, F.; Frattini, M.; Coccetti, P. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2112-2124.

⁴⁷⁸ Schneekloth, J. S. Jr.; Kim, J.; Sorensen, E. J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3096-3101.

Yields: **III.2** (34%), **III.5** (99%), **III.11** (99%), **III.12** (99%), **III.14** (61%), **III.15** (79%), **III.18** (20%), **III.21** (42%), **III.25** (45%).

Method I:⁴⁷⁹ aldehyde (1 mmol), amine (1 mmol), H₂O, r.t., 4 h.

Yields: **III.7** (67%), **III.8** (92%), **III.9** (95%), **III.10** (70%), **III.13** (84%), **III.16** (62%), **III.17** (41%), **III.19** (58%), **III.20** (55%), **III.22** (54%), **III.23** (88%), **III.26** (56%).

Cytotoxic activity of compounds **III.1-III.28** as well as resveratrol was measured after 72 h of incubation on HT-29 and MCF-7 tumor cell lines, as well as on HEK-293 non tumoral cell line (see table 4.9 for IC₅₀ values and α and β coefficients). Compounds **III.1**, **III.4**, **III.6**, **III.10**, **III.17** and **III.20** showed the highest cytotoxicities on HT-29 cells (5.9, 6.6, 3.1, 5.2, 9.7 and 6.3 μ g/mL, respectively). Compounds **III.1**, **III.3**, **III.6** and **III.7** showed the highest cytotoxicities on MCF-7 cells (3.0, 2.4, 3.0 and 4.1 μ g/mL, respectively). Compounds **III.1**, **III.6**, **III.17** and **III.20** show good therapeutic margins in both tumor cell lines (relatively high α and β values).

A selection of compounds was made for the study of VEGF protein and *VEGF*, *hTERT* and *c-Myc* gene expressions. To this purpose, compounds **III.1** (5 μ g/mL), **III.6** (5 μ g/mL), **III.10** (5 μ g/mL), **III.17** (9 μ g/mL), **III.20** (5 μ g/mL) and **III.26** (25 μ g/mL) were selected. The studies were carried out at concentrations indicated in brackets (resveratrol, 10 μ g/mL).

ELISA test was performed to evaluate VEGF protein secretion after incubation of HT-29 cells in the presence of selected compounds at above mentioned concentrations, including resveratrol, for 72 h. Results were compared with a positive control of cells treated with DMSO (see figure 4.33) The most active is compound **III.26**, which inhibits VEGF protein secretion by 35%, a higher value than that shown by resveratrol (19% inhibition).

VEGF gene expression was measured on traditional PCR analysis after incubation of HT-29 cells in the presence of selected compounds and resveratrol at concentrations indicated above for 72 h. Results were compared with a sample of cells treated with DMSO, β -actin was used as an endogenous control gene and ethidium bromide was used as intercalating agent (see figure 4.34). Compounds **III.20** and **III.26** showed the highest inhibition (49 and 42%, respectively), being more actives than resveratrol (13% *VEGF* inhibition).

⁴⁷⁹ Tanaka, K.; Shiraishi, R. *Green Chem.* **2000**, 2, 272-273.

To evaluate *hTERT* and *c-Myc* gene expressions, traditional PCR assays were performed on HT-29 cells at 72 h, using the same experimental procedure as in *VEGF* gene expression (see figure 4.35). Compounds under study were unable to inhibit *c-Myc* gene expression. In contrast, all compounds showed *hTERT* gene inhibition with figures ranging from 32 to 70% inhibition. Compounds **III.26**, **III.6** and **III.17** were especially active in downregulation *hTERT* gene expression (70, 63 and 63% inhibition, respectively). It is worth mentioning that resveratrol is virtually inactive in this respect.

In conclusion, compound **III.1**, which is devoid of substituents, shows a low activity. The presence of methoxyl (compound **III.6**) and hydroxyl substituents (compound **III.20**) increases the activity to a significant extent. The combination of these two substituents in a structure with a *para* relative position (compound **III.26**), gives rise to the highest activity within the imine series.

6.7. Sulphate, acyl and glucosyl resveratrol derivatives

In collaboration with Dr. J. C. Morales (*Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"*, CSIC-Granada) the biological evaluation of acyl and glucosyl resveratrol derivatives and also some resveratrol sulphate metabolites was carried out. The structure of these compounds, synthesized in the laboratories of Dr. Morales, is shown in figure 6.7.⁴⁸⁰

⁴⁸⁰ (a) Larrosa, M.; Tome-Carneiro, J.; Yanez-Gascon, M. J.; Alcantara, D.; Selma, M. V.; Beltran, D.; Garcia-Conesa, M. T.; Urban, C.; Lucas, R.; Tomas-Barberan, F.; Morales, J. C.; Espin, J. C. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7365-7376. (b) Raghuraman, A.; Riaz, M.; Hindle, M.; Desai, U. R. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6754-6758. (c) Hoshino, J.; Park, E. J.; Kondratyuk, T. P.; Marler, L.; Pezzuto, J. M.; van Breemen, R. B.; Mo, S.; Li, Y.; Cushman, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5033-5043. (d) Al-Horani, R. A.; Desai, U. R. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2907-2918.

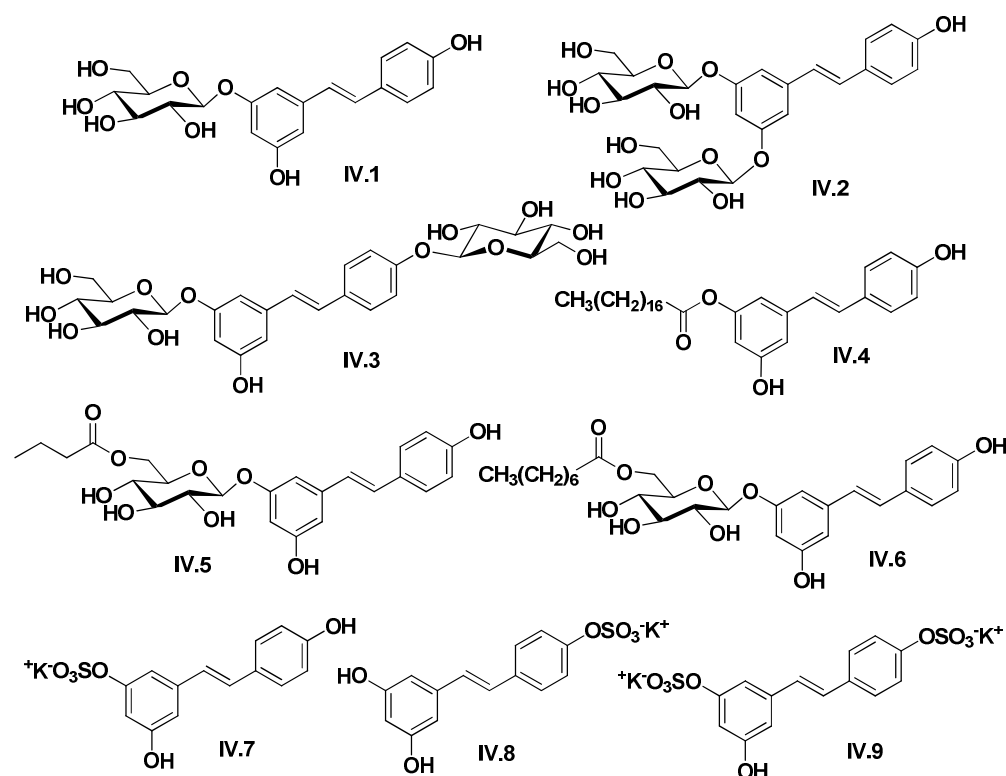


Figure 6.7. Acyl glucosil and resveratrol sulphated derivatives structure.

Cytotoxicity of compounds **IV.1-IV.9** as well as resveratrol was measured at 72 h on HT-29 and MCF-7 tumor cell lines and HEK-293 non-tumor cell line (see table 4.13 for IC_{50} values and for α and β coefficients). Compounds **IV.1** and **IV.2** (7 and 13.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively), with lower IC_{50} values than resveratrol (16.0 $\mu\text{g/mL}$), are the most active ones in HT-29 cells. In MCF-7 cell line, compounds **IV.1**, **IV.7** and **IV.9** are the most active ones (15, 5.9 and 12.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively), being more active than resveratrol itself (29 $\mu\text{g/mL}$). Compounds **IV.1**, **IV.2**, **IV.3** and **IV.9** show good therapeutic margins in both tumor cells (relatively high α and β values).

A selection of compounds was made for the study of VEGF protein and *VEGF*, *hTERT* and *c-Myc* gene expressions. Taking into account IC_{50} values, compounds **IV.1**, **IV.2**, **IV.6**, **IV.7**, **IV.8** and **IV.9** were selected.

For the biological studies, a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ was used in each of the compounds except for resveratrol, which was employed at a 20 $\mu\text{g/mL}$ concentration.

The ability to inhibit VEGF protein secretion in HT-29 cells was measured at 72 h using ELISA test (see figure 4.39). Compounds **IV.2** and **IV.6** show the highest inhibition, with inhibition values ranging 46 and 53%, respectively, higher than the value showed by resveratrol (33% inhibition).

In order to evaluate the *hTERT* gene expression qPCR assays were performed on HT-29 at 48 h. For that purpose, cells were incubated in the presence of selected compounds and resveratrol at concentrations indicated above for 48 h. β -actin was used as endogenous control gene and results were compared with cells treated with DMSO (see figure 4.40). Compounds **IV.2** and **IV.9** showed the highest inhibition, with inhibition values ranging 48% and 61% respectively, higher than the value showed by resveratrol (39% inhibition).

c-Myc gene expression was also evaluated using qPCR assays following the same procedure as in the *hTERT* study (see figure 4.41). Compound **IV.2** inhibits *c-Myc* gene expression by 34%, being thus less active than resveratrol (52% gene inhibition). The remaining compounds were essentially inactive.

In conclusion, compound **IV.2** is the most active glucosyl resveratrol derivative, with a significant ability to inhibit VEGF protein secretion and *hTERT* and *c-Myc* gene expressions. Compound **IV.9** is the most active sulphated resveratrol derivative, showing inhibition of VEGF protein secretion and *hTERT* gene expression.

6.8. Furylidenthiazolone and furylidenthioxothiazolidinone derivatives

The last chapter of this Thesis deals with the synthesis and biological evaluation of compounds bearing furylidenthiazolone and furylidenthioxothiazolidinone scaffolds whose structures are depicted in figure 6.8. These compounds, which were synthesized during the research stay at the University of Siena (Università degli Studi di Siena) under the guidance of Professor M. Botta, were originally designed as sirtuin inhibitors.

The furyl-aril moiety was prepared upon Suzuki⁴⁸¹ coupling reactions of (5-formylfuran-2-yl)boronic acid with the corresponding yodophenyl functionalized partner. The coupling compounds were submitted to a sequential one pot procedure with 2-thioxothiazolidin-4-one and the corresponding amine, or with

⁴⁸¹ Miyura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.

bis(carboxymethyl)trithiocarbonate and the corresponding amine, to afford the desired furylidenthiazolones and furylidenthioxothiazolidinones respectively.

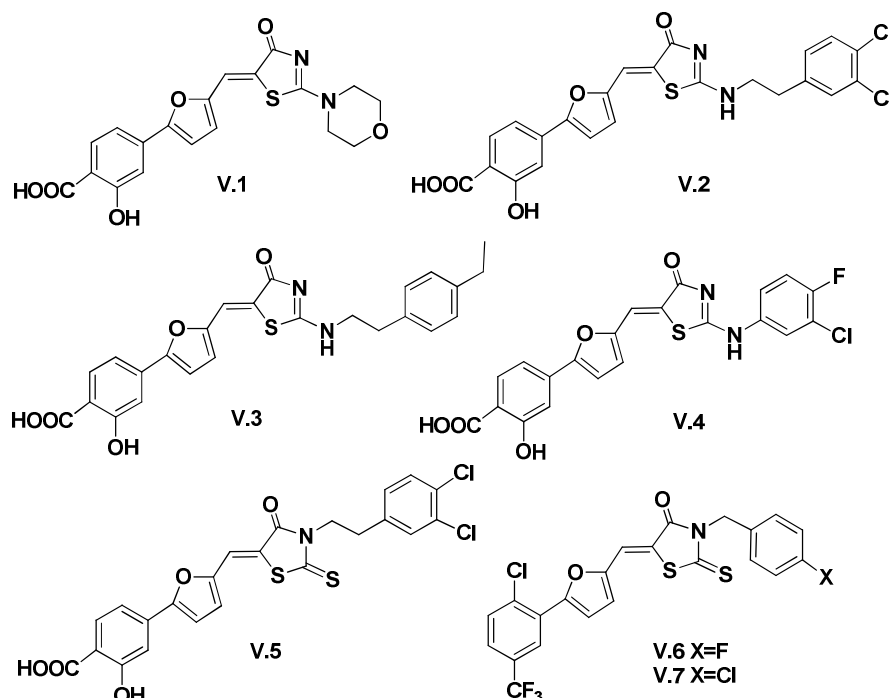


Figure 6.8. Furylidenthiazolone and furylidenthioxothiazolidinone derivatives structure.

A sample of each compound was evaluated in our laboratories of the Universitat Jaume I. First of all, cytotoxicity was determined with MTT assays at 48 h. Four different cell lines were used: two non-tumor cell lines, HEK-293 and BAEC, and two tumor cell lines, HT-29 and MCF-7 (see table 5.2 and table 5.3 for IC₅₀ values and for α , β , γ and δ coefficients).

Compounds **V.1**, **V.4**, **V.6** and **V.7** exhibit IC₅₀ values in the low micromolar range in HT-29 cells (2.3, 1.1, 8.3 and 4.6 μ M, respectively) and compounds **V.3**, **V.6** and **V.7** are the most cytotoxic ones in MCF-7 cells (4.5, 1.1 and 1.2 μ M, respectively). Compound **V.1** shows a good therapeutic margin on HT-29 and MCF-7 cell lines in front of HEK-293 and BAEC cells. Compound **V.4** shows a good therapeutic margin in HT-29 and MCF-7 cell lines in front of BAEC cells.

For further studies, a selection of compounds was made, so that compounds **V.2** and **V.5** were not selected because of their lack of activity in HT-29 cells. In all cases

lower IC₅₀ values in HT-29 cells were selected to preserve cell survival, and hence 1 μ M concentration was used with compounds **V.1**, **V.4** and **V.7**, 20 μ M concentration with compound **V.3** and 5 μ M concentration with compound **V.6**.

ELISA test was used to measure VEGF protein secretion in HT-29 cells measured at 72 h. For that purpose, cell were incubated in the presence of selected compounds at above mentioned concentrations for 72 h, comparing the results with cells treated with DMSO (see figure 5.6). Compound **V.1** inhibited slightly VEGF protein secretion (13% inhibition) and the inhibition of the remaining compounds was even lower with values ranging from 2 to 10%.

VEGF gene expression was determined by qPCR technique on HT-29 cells incubated for 48 h in the presence of the selected compounds at concentrations indicated above. *β -actin* was used as endogenous control gene and results were compared with cells treated with DMSO (see figure 5.7). In concordance with ELISA test, results achieved from qPCR analysis showed that compound **V.1** and also **V.4** inhibited *VEGF* gene expression by 13% and the remaining compounds inhibited *VEGF* gene expression even less with values ranging from 0 to 9%.

hTERT gene expression was also determined upon qPCR technique on HT-29 cells for 48 h following the same procedure as in *VEGF* gene (see figure 5.8). All compounds show a relatively good gene inhibition, which can be estimated around 50%, being compound **V.7** the most active one (63% inhibition).

c-Myc gene expression was also determined by qPCR technique on HT-29 cells for 48 h following the same procedure as in previous gene studies (see figure 5.9). The most active compounds are **V.1** and **V.4**, which showed 40% gene inhibition, followed by compounds **V.3** and **V.7** with 33 and 31% *c-Myc* gene inhibition, respectively.

In summary, furylidenthiazolone and furylidenthioxothiazolidinone derivatives show much better activities in the telomerase-related genes *hTERT* and *c-Myc* than in the angiogenesis-related VEGF protein secretion and *VEGF* gene.

CAPÍTULO 7
PUBLICACIONES Y
COMUNICACIONES A
CONGRESOS DERIVADAS
DE ESTA TESIS

CAPÍTULO 7. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA TESIS

7.1. Comunicaciones a congresos

Los resultados de esta Tesis han sido expuestos en los siguientes congresos:

- Comunicación tipo poster: *"Synthesis and biological evaluation of resveratrol analogues as anticangiogenic drugs"*.
Rosa Martí-Centelles, Eva Falomir, Rocío Cejudo-Marín, Juan Murga, Miguel Carda.
48th RICT 2012 International Conference on Medicinal Chemistry (Poitiers, Francia).
- Comunicación tipo poster: *"Synthesis and Biological Evaluation of Simplified Resveratrol Analogues as Anticarcinogenic Drugs"*.
Rosa Martí-Centelles, Eva Falomir, Rocío Cejudo-Marín, Juan Murga, Miguel Carda, J. Alberto Marco.
Discovery Chemistry Congress 2013 (Munich, Alemania).
- Comunicación tipo poster: *"Antiangiogenic and Antitelomerase Evaluation of Iminated Resveratrol Analogues"*.
Rosa Martí-Centelles, Salvador Guardiola, Eva Falomir, Juan Murga, Miguel Carda, J. Alberto Marco.
49th RICT 2013 International Conference on Medicinal Chemistry (Niza, Francia).
- Comunicación tipo poster: *"Aminated Resveratrol Analogues As Potencial Anticancer Drugs"*.
Rosa Martí-Centelles, Eva Falomir, Juan Murga, Miguel Carda, J. Alberto Marco.
Spanish-Italian Medicinal Chemistry Congress 2015 (Barcelona, España).

- Comunicación tipo poster: “*Síntesis y evaluación biológica de (E)-metoxiestirilpiridina y pirimidinas como potenciales agentes anticáncer*”.
Rosa Martí-Centelles, Eva Falomir, Juan Murga, Miguel Carda, J. Alberto Marco.
XXXV Bienal RSEQ 2015 (A Coruña, España).

7.2. Publicaciones

Los resultados de esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

- Inhibition of VEGF expression in cancer cells and endotelial cell differentiation by synthetic stilbene derivatives.
Rosa Martí-Centelles, Rocío Cejudo-Marín, Eva Falomir, Juan Murga, Miguel Carda, J. Alberto Marco.
Bioorganic & Medicinal Chemistry **2013**, 21, 3010-3015.
Véase el documento adjunto (páginas 272-277).
- Inhibitory effect of cytotoxic stilbenes related to resveratrol on the expression of the *VEGF*, *hTERT* and *c-Myc* genes.
Rosa Martí-Centelles, Eva Falomir, Juan Murga, Miguel Carda, J. Alberto Marco.
European Journal of Medicinal Chemistry (enviado a publicar).
- Inhibitory effect of cytotoxic nitrogen-containing heterocyclic stilbene analogues on the VEGF protein secretion and the expression of the *VEGF*, *hTERT* and *c-Myc* genes.
Rosa Martí-Centelles, Juan Murga, Eva Falomir, Miguel Carda, J. Alberto Marco.
Medicinal Chemistry Communications (enviado a publicar).

- Cytotoxic, antiangiogenic and antitelomerase activity of glucosyl- and acyl- resveratrol prodrugs and resveratrol sulfate metabolites.

Eva Falomir, Ricardo Lucas, Rosa Martí-Centelles, Alexia Dupont, Miguel Carda, Juan C. Morales.

ChemBioChem (enviado a publicar).

- Inhibitory effect of benzylidene anilines structurally related to resveratrol on the VEGF protein secretion and the expression of the *VEGF*, *hTERT* and *c-Myc* genes.

Rosa Martí-Centelles, Juan Murga, Eva Falomir, Miguel Carda, J. Alberto Marco.

Molecules (enviado a publicar).



Inhibition of VEGF Expression in Cancer Cells and Endothelial Cell Differentiation by Synthetic Stilbene Derivatives

Rosa Martí-Centelles,^a Rocío Cejudo-Marín,^a Eva Falomir,^{a,*} Juan Murga,^a Miguel Carda^a and J. Alberto Marco^b

^aDepart. de Q. Inorgánica y Orgánica, Univ. Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

^bDepart. de Q. Orgánica, Univ. de Valencia, E-46100 Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received

Received in revised form

Accepted

Available online

Keywords:

angiogenesis
antiangiogenic compounds
stilbenes
resveratrol
VEGF
gene regulation
endothelial differentiation
anticancer drugs

ABSTRACT

We here report the synthesis of several stilbene derivatives. They show a measurable inhibitory effect on angiogenesis, some of them to a higher degree than resveratrol. Test methods included cell proliferation and tube formation assays using bovine aorta endothelial cells. In addition, it has been confirmed through the reverse transcriptase/polymerase chain reaction experiment that these stilbene derivatives downregulate the expression of the gene related to the production of the angiogenesis factor VEGF in cancer cells.

2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is widely known that cancer, one leading cause of death in developed countries,¹ may be caused by both external and internal factors, including genetic mutations.^{2,3} One main therapeutic line is the use of cytotoxic drugs, which exert their effect in many cases by means of inducing cell apoptosis (programmed cell death).⁴ Another useful strategy is based on the use of compounds with an inhibitory ability on the formation of blood vessels (angiogenesis).^{5,6} Tumor angiogenesis is a very complex process and involves the tight interplay of many factors.⁷ One of these is a protein called vascular endothelial growth factor (VEGF), a key regulator of angiogenesis which drives endothelial cell survival, proliferation and migration while increasing vascular permeability.⁸ In fact, overexpression in the production of VEGF has been reported to occur in many types of tumors.⁹ It is therefore not surprising that VEGF has become one further target molecule in cancer therapy.^{10,11}

Many phytochemicals, often present in food, have been shown to have an influence in tumor angiogenesis.^{12,13} Among the promising dietary phytochemicals known to exhibit antiangiogenic activity,¹⁴ some pertain to the stilbene class of natural polyphenols.¹⁵ Resveratrol (Fig. 1), one naturally occurring member of this class, has been found to exhibit a remarkable both chemopreventive and chemotherapeutic potential.¹⁶ It has been identified in various food sources

including red grapes, peanuts and mulberries. Even though its molecular target is still unknown,¹⁷ it is well documented that resveratrol has broad-spectrum health beneficial effects, such as anti-infective, antioxidant, and cardioprotective functions.¹⁸ It has also been found to alter tumor cell growth and survival by means of a downregulation of the expression of genes involved in cancer.¹⁹ For that reason, resveratrol and many of its synthetic analogues^{18,20} have been intensively investigated in relation to their possible therapeutic use.

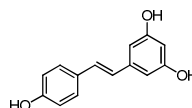


Figure 1. Structure of resveratrol.

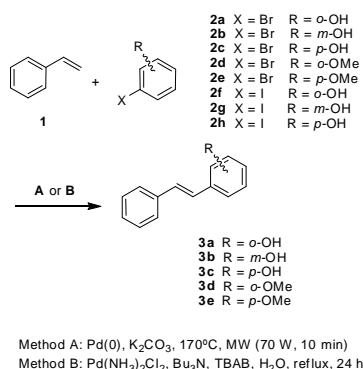
2. Research purpose

As part of our research project related to design, synthesis and biological evaluation of anticancer agents, we focused on the search of small molecules that could inhibit both endothelial cell differentiation and expression of certain oncogenes and proteins in tumor cells. Furthermore, and in order to prevent damaging of healthy cells, we are looking for molecules that exert these inhibitory properties at non toxic concentrations.

We initially focused our attention on resveratrol because of its well-known antiangiogenic properties.¹⁹ Unfortunately, its bioavailability is low because it exhibits a high metabolism rate due to the fact that it binds to plasma proteins forming sulphates and glucuronide conjugates.²⁰ With these precedents in mind, we decided to evaluate the antitumoral properties of structurally simple resveratrol analogues that exhibit both strong antitumoral properties and a higher bioavailability than the parent compound. Our first generation of analogues includes simple stilbene derivatives with less free hydroxyl groups than resveratrol itself (compounds **3a-3e** and **4a-4b**, Scheme 1). Furthermore, we have investigated the effect on the transcription of genes related to the production of the angiogenesis-associated factor VEGF. In all biological assays, resveratrol was used as the reference compound for comparison.

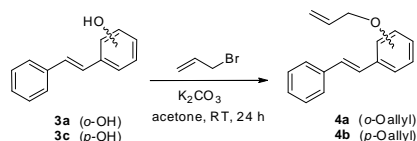
3. Chemical results

A range of synthetic strategies has been developed for the preparation of stilbene derivatives. Some of them rely on the creation of the C=C bond through Wittig-like olefinations.^{21a,b,22} Other methods center on the formation of the C_{sp²-Ar bond by means of palladium-catalyzed cross couplings.²³ In the present case, we have employed Heck couplings of styrene **1** with halogenated derivatives of either phenol (**2a-c** and **2f-2h**) or methyl phenyl ether (**2d-e**) under two different reaction conditions A^{23b} and B²⁴ (for more experimental details and yields, see Experimental Section). Couplings under conditions A are carried out with very low catalyst loadings and involve the use of microwaves (MW), which have often been found to accelerate coupling reactions.²⁵}



Scheme 1. Synthesis of stilbenes **3a-3e** via Heck coupling

In order to see the effect of the *O*-alkyl group size on the aforementioned biological properties, we have subjected stilbenes **3a** and **3c** to *O*-allylation as depicted in Scheme 2. Details about yields and reaction conditions are given in the Experimental Section.



Scheme 2. Synthesis of *O*-allyl derivatives **4a** and **4b**.

4. Biological results

4.1. Cytotoxicity and inhibition of tube formation by stilbene derivatives in bovine aortic endothelial cells

Since angiogenesis involves the local proliferation of endothelial cells, we investigated the ability of stilbenes **3a-3e** and **4a-4b**, as well as resveratrol as the reference compound, to inhibit the growth of bovine aortic endothelial (BAE) cells. IC₅₀ values of this antiproliferative effect are shown in Table 1. We found an IC₅₀ = 48 μmol/L for resveratrol, which is in the range of concentrations described by others for the endothelial cell growth inhibition by this compound.²⁶ Our data indicate that the IC₅₀ values for stilbene derivatives range from 33.6 to >400 μmol/L, indicating that some of these compounds exhibit a lower toxicity than resveratrol. The final event during angiogenesis is the organisation of endothelial cells in a three-dimensional network of tubes, as shown in Figure 2a for a control experiment using dimethylsulfoxide (DMSO). *In vitro*, endothelial cells plated on Matrigel align themselves forming cords, already evident a few hours after plating. Figure 2b shows that 54.8 μmol/L resveratrol was able to completely inhibit BAE cell alignment and cord formation, what is in good agreement with previously reported data.^{26a} A complete inhibition of endothelial morphogenesis on Matrigel was obtained with a concentration of 32 μmol/L for compounds **3a**, **3b** and **3c** (Fig. 2c-e), about 50-60 μmol/L for compounds **3d** and **4a** (Fig. 2f and 2h), 106 μmol/L for compound **4b** (Fig. 2i) or with 475 μmol/L for compound **3e** (Fig. 2g).

Table 1. Cytotoxicity and inhibition of angiogenesis *in vitro* by resveratrol and stilbene derivatives **3a-3e** and **4a-4b**.

Compound	IC ₅₀ ^{a,b}	MIC tube formation ^c	IC ₅₀ ^{d,b}
3a	107 ± 15	32	112 ± 15
3b	91.7 ± 10	32	127 ± 5
3c	33.6 ± 2.5	32	34.6 ± 2
3d	152 ± 19	59.5	42.8 ± 5
3e	418 ± 90	475 ^e	26 ± 2.5
4a	313 ± 31	53	55 ± 4
4b	> 400	106 ^e	23 ± 3
Resveratrol	48 ± 4	54.8	110 ± 13

^aIC₅₀ values related to BAE cells are expressed as the compound concentration (in μmol/L) that causes 50% inhibition of cell growth. ^bMean values (± s.d.) of three different experimental values, as described in the Material and Methods section. ^cMinimal inhibitory concentration (in μmol/L) of BAE cell differentiation for the different tested compounds. The differentiation assay was carried out in the presence of different concentrations of resveratrol and related stilbenes, as described in the Material and Methods section. ^dIC₅₀ values related to human colon adenocarcinoma cancer cells (HT-29) are expressed as the compound concentration (in μmol/L) that causes 50% inhibition of cell growth. ^eCompound partially insoluble at this concentration.

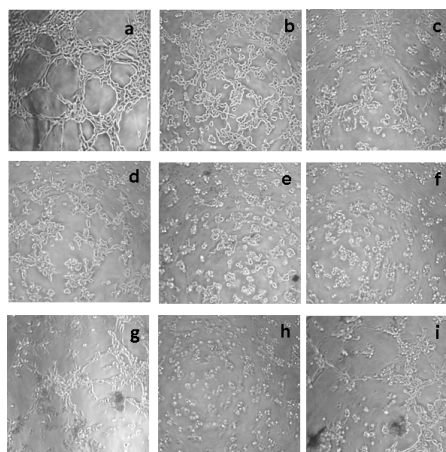


Figure 2. Effect of resveratrol and stilbene derivatives on endothelial cell tubulogenesis *in vitro*: a) control (DMSO); b) resveratrol, 54.8 $\mu\text{mol/L}$; c) **3a**, 32 $\mu\text{mol/L}$; d) **3b**, 32 $\mu\text{mol/L}$; e) **3c**, 32 $\mu\text{mol/L}$; f) **3d**, 59.5 $\mu\text{mol/L}$; g) **3e**, 475 $\mu\text{mol/L}$; h) **4a**, 53 $\mu\text{mol/L}$; i) **4b**, 106 $\mu\text{mol/L}$.

4.2. Effect of resveratrol and stilbenes **3a**, **3d** and **4a** on the transcription of the VEGF gene in human colon adenocarcinoma cell line (HT-29)

In relation to the fact that angiogenesis begins with the release of VEGF from cancer cells, we decided to examine whether our resveratrol analogues were able to inhibit or at least decrease the activation of VEGF genes in HT-29 tumoral cells. First, we have investigated the ability of stilbenes **3a-3e**, **4a-4b** and resveratrol to inhibit the growth of HT-29 cells (see IC_{50} values in Table 1). Subsequently, we treated these cells with each of the aforementioned compounds at a concentration below their corresponding IC_{50} values. We used untreated cells as a negative control (–) and cells treated only with DMSO as a positive control (+). Finally, we have performed a reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis which has shown that stilbene derivatives such as those described here are able to reduce the transcription of VEGF mRNA in HT-29 cells. As shown in Figure 3, treatment of the cells with **3a**, **3d**, **4a** and resveratrol in DMSO (10 $\mu\text{g/mL}$ of each compound, which corresponds to concentrations in the range between 42 and 51 $\mu\text{mol/L}$), did in fact reduce the transcription of VEGF mRNA to up half its value as compared with control cells.

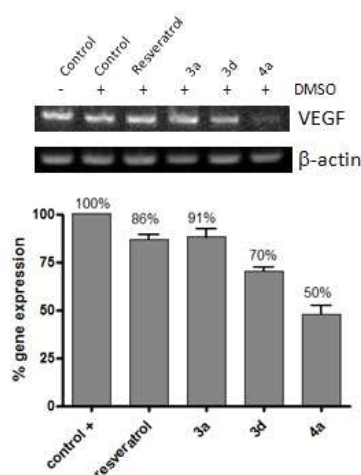


Figure 3. Agarose gel profile of products resulting from RT-PCR amplification. The total RNA of HT-29 cells previously treated with resveratrol, **3a**, **3d** and **4a** was isolated (10 $\mu\text{g/mL}$ each compound), converted into cDNA, and amplified by PCR as described in the Materials and Methods section (primers used for the RT-PCR are shown in Table 2). Gene expression of VEGF and β -actin was quantified using the Image J program and normalized to that of the housekeeping gene β -actin. At least three measures were performed in each case. Bars shown represent mean activations of VEGF gene expression and error bars indicate standard errors of the mean. Statistical significance was evaluated using one-sample t-tests ($P < 0.001$).

We have also determined VEGF protein production by ELISA in culture supernatants. Figure 4 shows the results obtained in the ELISA measurements after treatment of HT-29 cells with **3a**, **3d**, **4a** and resveratrol in DMSO (10 $\mu\text{g/mL}$ each compound, approximate concentrations in the range between 42 and 51 $\mu\text{mol/L}$). In comparison with untreated cells, compounds **3a** and **4a** are more effective in decreasing VEGF secretion in HT-29 cells than resveratrol.

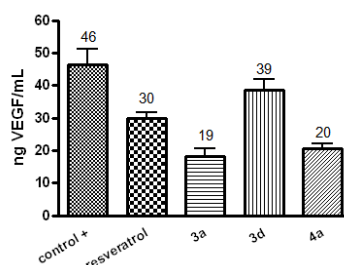


Figure 4. Expression of VEGF from HT-29 cells treated with DMSO, resveratrol, **3a**, **3d** and **4a**. At least three measurements were performed in each case. Bars shown represent mean values of VEGF expression (in ng/mL) and error bars indicate standard errors of the mean. Statistical significance was evaluated using one-sample t-tests ($P < 0.001$).

5. Discussion

A few years ago, Kimura and coworkers investigated the antitumor and antimetastatic properties of a library of stilbene s, among them resveratrol and other mono and polyhydroxylated stilbene derivatives, including compounds **3a-3c**.²⁷ Working with human umbilical vein endothelial cells, these authors found that some dihydroxylated resveratrol derivatives were able to inhibit VEGF-induced endothelial cell migration /differentiation and angiogenesis. However, they did not test the monohydroxylated derivatives **3a-c** as inhibitors of endothelial cell differentiation, a key step of the angiogenic process.

As a matter of fact, our results using BAE cells indicate that structurally simple stilbene derivatives are able to inhibit endothelial cell differentiation at non toxic concentrations. Furthermore, three of these compounds (**3a-3c**) exhibit a higher antiangiogenic activity than resveratrol itself in the *in vitro* assay (see Table 1). It should also be pointed out that some of our compounds (**3a, 3b, 3d, 4a** and **4b**) are able to completely inhibit tube formation by endothelial cells at concentrations that are far below their IC₅₀ values in the MTT assay (see Materials and Methods). This indicates that their toxicities at the concentrations needed for inhibition of angiogenesis are lower than in the case of resveratrol, therefore suggesting a lower probability of the appearance of antiproliferation-derived side effects.

As a further outcome of this study, we have established that resveratrol and several stilbene derivatives lead to a decrease in the production of VEGF by HT-29 cells. ELISA measurements of culture supernatants after treatment of HT-29 cells with each of the compounds under study have revealed that **3a** and **4a** decrease VEGF production to a higher extent than resveratrol. As a matter of fact, while the latter diminishes the VEGF production to about 65% of the value observed with DMSO (control +), compounds **3a** and **4a** cause a decrease in the VEGF production to a higher extent (to about only 41% of the control + value, see Figure 4).

A comparison of data obtained from ELISA experiments with those obtained in relation to VEGF gene transcription indicates that, except for compound **4a**, there is no correlation between VEGF mRNA levels and VEGF secreted levels. Indeed, compound **4a** strongly suppressed the expression of VEGF gene whereas compound **3a** only caused a weak suppression (50% vs. 91%, Fig. 3). However, the secreted VEGF levels in the media were very similar (Fig. 4). In addition, compound **3d** suppressed the expression of VEGF mRNA to a moderate extent compared with resveratrol (70% vs 86%, Fig. 3) but the secreted VEGF level was higher than of the latter compound. These results indicate on one hand that compound **4a** does indeed cause decrease in VEGF production by means of a downregulation in the expression of the corresponding gene. On the other hand, the results also suggest that **3a** and resveratrol lead to a decrease in VEGF production through interference at a different phase in the genesis of the growth factor.

It is worth noting here that stilbene derivative **4a** is able to decrease VEGF transcription by 50% at a concentration of 10 µg/mL (compared with 86% for resveratrol at the same concentration), clearly below its IC₅₀ value with BAE cells (Fig. 3 and Table 1). This indicates that **4a** retards tumor angiogenesis at non toxic concentrations by means of reduction in VEGF production in tumoral cells and, consequently, by complete inhibition of capillary-like tube formation. These features suggest that **4a** may be a potentially valuable anticancer agent with fewer side effects than other anticancer agents. Moreover, the fact that

compound **4a** presents no free hydroxyl groups could be an advantage because it may exhibit a lower metabolism rate as it is not able to form glucuronide conjugates.

6. Materials and Methods

6.1. Chemistry: general procedures

General features. NMR spectra were measured at 25 °C. The signals of the deuterated solvent (CDCl₃) were taken as the reference. Multiplicity assignments of ¹³C signals were made by means of the DEPT pulse sequence. IR spectra were measured as KBr pellets. Commercially available reagents were used as received.

6.2. Reaction conditions

6.2.1. Heck couplings

Conditions A.^{23b} The synthesis of 4-methoxystilbene **3e** is described as a representative example: In a 10-mL glass tube was placed 4-bromoanisole **2e** (125 µL, 1 mmol), styrene (230 µL, 2 mmol), K₂CO₃ (511 mg, 3.7 mmol), tetra-*n*-butylammonium bromide (322 mg, 1 mmol), palladium stock solution (0.4 mL of a 1000 ppm solution in water), and water (1.6 mL) to give a total volume of water of 2 mL and a total palladium concentration of 200 ppm. The vessel was sealed with a septum, shaken, and placed into the microwave cavity. Initial microwave irradiation of 70 W was used, the temperature being increased from room temperature to the final value of 170 °C. Once this was reached, the reaction mixture was held at this temperature for 10 min. After allowing the mixture to cool to room temperature, the reaction vessel was opened and the contents poured into a separating funnel. Water (30 mL) and ethyl acetate (30 mL) were added and the organic material was extracted and removed. After further extraction of the aqueous layer with ethyl acetate, combination of the organic layers and desiccation over anhydrous MgSO₄, the ethyl acetate was removed in vacuo leaving **3e** in 88% yield. The product was characterized by comparison of its physical and spectral data with those in the literature.^{22a,23b,d}

The same conditions were used for the synthesis of stilbenes **3a-d** from the corresponding bromoarenes **2a-d**. Yields were: **3a** (63 %), **3b** (68 %), **3c** (26 %), and **3d** (81 %). Products were characterized by comparison of their physical and spectral data with those in the literature.^{22a,23b,d}

Conditions B.²⁴ The synthesis of 2-hydroxystilbene **3a** from 2-iodophenol **2f** is described as a representative example: 2-iodophenol (115 µL, ca. 1 mmol), styrene (172 µL, 1.5 mmol), tri-*n*-butylamine (480 µL, 2 mmol), tetra-*n*-butylammonium bromide (322 mg, 1 mmol) were suspended in water (4 mL). The mixture was stirred to homogeneity and then treated with Pd(NH₃)₂Cl₂ (3 mg, 0.015 mmol). The mixture was heated at reflux (bath temperature, 140 °C) for 24 h, then cooled and extracted three times with EtOAc. The organic layers were dried on anhydrous MgSO₄ and filtered. Removal of volatiles under reduced pressure gave a solid (119 mg, 86%), which was shown to be **3a** by comparison of their physical and spectral data with those in the literature.

The same conditions were used for the synthesis of stilbenes **3b** and **3c** from the corresponding iodoarenes **2g** and **2h**. Yields were: **3b** (65 %) and **3c** (97 %). For stilbenes **3d** and **3e**, bromoarenes **2d** and **2e** were used instead of the corresponding iodoarenes. Yields were: **3d** (65 %) and **3e** (78 %).

6.2.2. O-Allylation of phenols

A solution of **3a** (196 mg, 1 mmol) in acetone (15 mL) was treated with allyl bromide (260 μ L, 3 mmol) and K_2CO_3 (415 mg, 3 mmol). The mixture was stirred at reflux under N_2 for 24 h. Subsequently, the mixture was filtered through silica gel, with additional washing of the silica gel pad with EtOAc. Removal of all volatiles under reduced pressure gave **4a** (187 mg, 79%). The product was characterized by means of comparison of its physical and spectral data with those in the literature.²⁸

Under the same conditions, stilbene **3c** was converted into its *O*-allyl derivative **4b** in 90% yield: white solid, mp 120–121 °C; 1H NMR (500 MHz) δ 7.48 (2H, br d, $J \sim 7.4$ Hz), 7.43 (2H, br d, $J \sim 8.8$ Hz), 7.33 (2H, t, $J \sim 7.6$ Hz), 7.22 (1H, tt, $J \sim 7.6, 1.5$ Hz), 7.05 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 6.90 (2H, br d, $J \sim 8.8$ Hz), 6.05 (1H, ddt, $J = 17.5, 10.4, 5.5$ Hz), 5.42 (1H, dq, $J = 17.5, 1.5$ Hz), 5.29 (1H, dd, $J = 10.4, 1.5$ Hz), 4.54 (2H, dt, $J = 5.5, 1.5$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz) δ 158.3, 137.6, 130.3 (C), 133.2, 128.6 (x 2), 128.2, 127.7 (x 2), 127.2, 126.7, 126.3 (x 2), 115.0 (x 2) (CH), 117.7, 68.9 (CH₂); HR EIMS m/z 236.1206 (M^+). Calcd. for $C_{17}H_{16}O$, 236.1201.

6.3. Biological procedures

6.3.1. Reagents and cell culture

Cell culture media were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA) and Biowhittaker (Walkersville, MD, USA). Fetal bovine serum (FBS) was a product of Harlan-Seralab (Belton, U.K.). Matrigel was purchased from Becton Dickinson (Bedford, MA, USA). Supplements and other chemicals not listed in this section were obtained from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, Mo., USA). Plastics for cell culture were supplied by NUNC (Roskilde, Denmark). Stilbenes **3a-e** and **4a-b** (samples purified by crystallization) as well as resveratrol were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/mL and stored at $-20^\circ C$ until use.

BAE cells were obtained as reported²⁹ by collagenase digestion. Human colon adenocarcinoma (HT-29) cells were obtained from American Type Culture Collection. Both cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing glucose (1 g/L), glutamine (2 mM), penicillin (50 IU/mL), streptomycin (50 μ g/mL) and amphoterycin (1.25 μ g/mL), supplemented with 10% FBS.

6.3.2. Cell proliferation assay

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) dye reduction assay in 96-well microplates was used, as previously described.³⁰ Some 3×10^3 BAE cells or 5×10^3 in case of HT-29 cells in a total volume of 100 μ L of their respective growth media were incubated with serial dilutions of the tested compounds. After 3 days of incubation (37 °C, 5% CO_2 in a humid atmosphere) 10 μ L of MTT (5 mg/ml in PBS) were added to each well and the plate was incubated for further 4 h (37 °C). The resulting formazan was dissolved in 150 μ L of 0.04 N HCl/2-propanol and read at 550 nm. All determinations were carried out in triplicate. IC₅₀ values mean the concentration of compound yielding a 50% of cell survival.

1.1.3. Endothelial cell differentiation assay: tube formation on Matrigel

Matrigel (50 μ L of about 10.5 mg/mL) at 4 °C was used to coat each well of a 96-well plate and allowed to polymerize at 37 °C for a minimum of 30 min as previously described.³¹ Some 5×10^4 BAE cells were added with 200 μ L of DMEM. Finally, different amounts of the tested compounds were added and incubated at 37 °C in a humidified chamber with 5% CO_2 . After

incubation for 7 h, cultures were observed (200 x magnification) and photographed with a NIKON inverted microscope DIAPHOT-TMD (NIKON Corp., Tokyo, Japan). Two different observers evaluated the results of tube formation inhibition.

6.3.4. RT-PCR analysis

HT-29 cells at 70–80% confluence were collected after serum starvation for 24 h. Cells were incubated with 20 μ g/mL resveratrol in DMSO and with 10 μ g/mL stilbene **3b** in DMSO for 48 h. Cells were collected and the total cellular RNA from HT-29 cells was isolated using Ambion RNA extraction Kit according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized by MMLV-RT with 1–21 μ g of extracted RNA and oligo(dT)15 according to the manufacturer's instructions. Gene-specific PCR primers (see Table 2) were then added for amplification. PCR products were analysed by electrophoresis on 1.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining under UV transillumination. The sequences of primers used in the RT-PCR are listed in Table 2. The PCR conditions were as follows: VEGF at 94 °C for 30 s, at 58 °C for 1 min, and at 72 °C for 1 min 50s; and β -actin at 94 °C for 30 s, at 58 °C for 50 s, and at 72 °C for 50 s. Analysis of β -actin was used to monitor RNA integrity and accuracy of loading.³²

Table 2. Primers used and sizes of the PCR products

VEGF	Sense: 5'-CCTGATGAGATCGAGTACATCTE3' Antisense: 5'-ACCGCCTCGGCTTGTCAG3'	379
β -Actin	Sense: 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATC CGT-3' Antisense: 5'-CGTAGAAGCATTTGCGGTGCAC GATG-3'	287

6.3.5. ELISA analysis

HT-29 cells at 70–80% confluence were collected after serum starvation for 24 h. Cells were incubated with 20 μ g/mL resveratrol in DMSO and with 10 μ g/mL of the corresponding stilbene in DMSO for 72 h. Culture supernatants were collected and VEGF secreted by HT-29 cells was determined using Invitrogen Human Vascular Endothelial Growth Factor ELISA Kit according to the manufacturer's instructions.

Acknowledgments

Financial support has been granted to M. C. by the Spanish Ministry of Education and Science (projects CTQ2008-02800 and CTQ2011-27560), by the Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciencia de la Generalitat Valenciana (ACOMP09/113) and by the BANCAJA-UJI Foundation (PI-1B-2008-14 and PI-1B2011-37). We thank Rafael Pulido for providing HT-29 cells.

References and notes

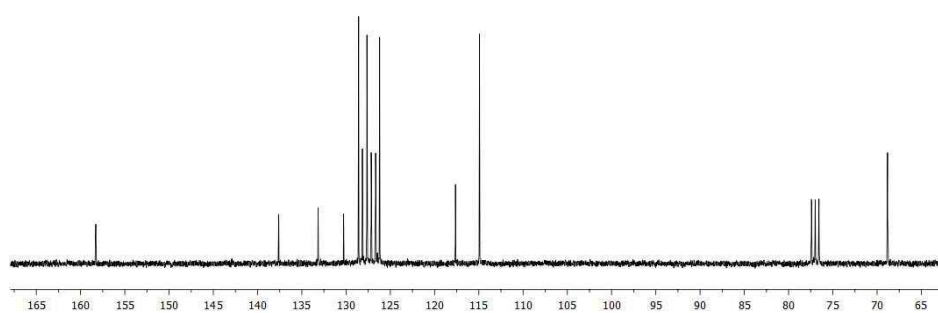
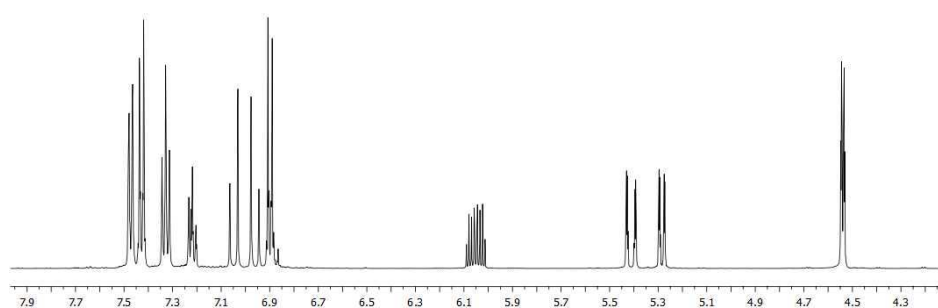
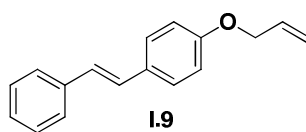
- Garcia, M.; Jemal, A.; Ward, E. M.; Center, M. M.; Hao, Y.; Siegel, R. L.; Thun, M. J. *Global Cancer Facts & Figures 2007* American Cancer Society, Atlanta, GA **2007**.
- (a) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57–70. (b) Stratton, M. R.; Campbell, P. J.; Futreal, P. A. *Nature* **2009**, *458*, 719–724.
- (a) Boyle, F. T.; Costello, G. F. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 251–261. (b) Gibbs, J. B. *Science* **2000**, *287*, 1969–1973.
- (a) Penn, L. Z. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2001**, *2*, 684–692. (b) Zhou, B.; Liu, Z.-L. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 1887–1903. (c) Park, H.-J.; Jung, H.-J.; Lee, K.-T.; Choi, J. *Nat. Prod. Sci.* **2006**,

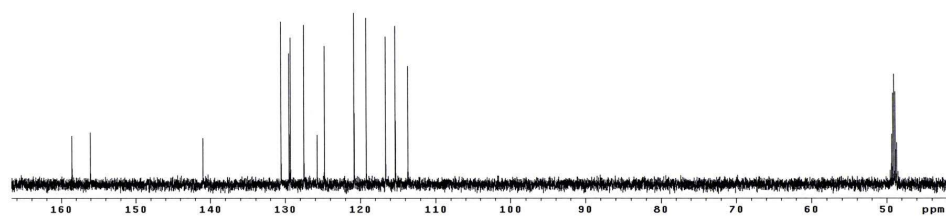
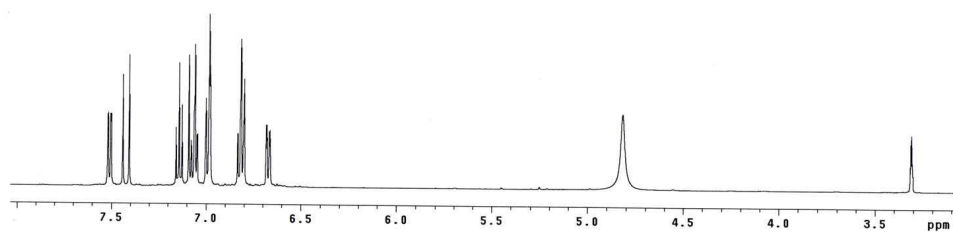
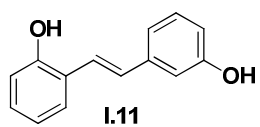
- 12, 175-192. (d) Portt, L.; Norman, G.; Clapp, C.; Greenwood, M.; Greenwood, M. T. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 238-259. (e) Torres-Andón, F.; Fadeel, B. *Acc. Chem. Res.* **2012**, in press.
5. (a) Folkman, J.; Merler, E.; Abernathy, C.; Williams, G. *J. Exp. Med.* **1971**, *133*, 275-288. (b) Folkman, J. *New Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186.
 6. (a) Folkman, J. *Ann. Surg.* **1972**, *175*, 409-416. (b) Folkman, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 273-286. (c) *Tumor Angiogenesis: From Molecular Mechanisms to Targeted Therapy* (Markland, F. S.; Swenson, S.; Minea, R.; Eds), WileyBlackwell, **2010**.
 7. (a) Ferrara, N. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 617-624. (b) Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2011**, *473*, 298-307.
 8. Moghaddam, S. M.; Amini, A.; Morris, D. L.; Pourgholami, M. H. *Cancer Metastasis Rev.* **2012**, *31*, 143-162.
 9. (a) Zhu, Z.; Witte, L. *Invest. New Drugs* **1999**, *17*, 195-212. (b) *VEGF and Cancer* (Harmey, J. H.; Ed.), Landes Bioscience, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Georgetown, Texas, **2004**. (c) Merrill, M. J.; Oldfield, E. H. *J. Neurosurgery* **2005**, *103*, 853-868. (d) Caldwell, R. B.; Bartoli, M.; Behzadian, M. A.; El Remessy, A. E. B.; Al-Shabraway, M.; Platt, D. H.; Liou, G. I.; Caldwell, R. W. *Curr. Drug Targets* **2005**, *6*, 511-524. (e) Carmeliet, P. *Oncology* **2005**, *69*, 4-10. (f) Okines, A. F. C.; Reynolds, A. R.; Cunningham, D. *Oncologist* **2011**, *16*, 844-858.
 10. For some recent references, see, for example: (a) Waldner, M. J.; Neurath, M. F. *Expert Opin. Ther. Targets* **2012**, *16*, 5-13. (b) Korpany, G.; Smyth, E. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2680-2701. (c) Linkous, A. G.; Yazlovitskaya, E. M. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 1-12.
 11. Antiangiogenic therapies are not completely devoid of problems. See, for example: (a) Medina, M. A.; Muñoz-Chapuli, R.; Quesada, A. R. *J. Cell. Mol. Med.* **2007**, *11*, 374-382. (b) Quesada, A. R.; Medina, M. A.; Muñoz-Chapuli, R.; Ponce, A. L. *G. Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3932-3957. (c) De Bock, K.; Mazzzone, M.; Carmeliet, P. *Nature Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 393-404. (d) Casanovas, O. *Nature* **2012**, *484*, 44-46.
 12. (a) Singh, R. P.; Agarwal, R. *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 205-217. (b) Dorai, T.; Aggarwal, B. B. *Cancer Lett.* **2004**, *215*, 129-140. (c) Singh, A. V.; Franke, A. A.; Blackburn, G. L.; Zhou, J.-R. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1851-1858. (d) Wahl, O.; Oswald, M.; Tretzel, L.; Herres, E.; Arend, J.; Efferth, T. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3136-3155. (e) Lamy, S.; Akla, N.; Ouanouki, A.; Lord Dufour, S.; Beliveau, R. *Exp. Cell Res.* **2012**, *318*, 1586-1596.
 13. (a) Carmeliet, P. *Nature* **2005**, *438*, 932-936. (b) Potente, M.; Gerhardt, H.; Carmeliet, P. *Cell* **2011**, *146*, 873-887.
 14. Kimura, Y.; Sumiyoshi, M. *Curr. Top. Phytochem* **2011**, *10*, 75-96.
 15. Shen, T.; Wang, X.-N.; Lou, H.-X. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 916-935.
 16. (a) Kraft, T. E.; Parisotto, D.; Schempp, C.; Efferth, T. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 782-799. (b) Whitlock, N. C.; Baek, S. J. *Nutr. Cancer* **2012**, *64*, 493-502.
 17. Tennen, R. I.; Michishita-Kioi, E.; Chua, K. F. *Cell* **2012**, *148*, 387-389.
 18. (a) Neves, A. R.; Lucio, M.; Lima, J. L. C.; Reis, S. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1663-1681. (b) Nakata, R.; Takahashi, S.; Inoue, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 273-279.
 19. (a) Kundu, J. K.; Surh, Y. J. *Mutat. Res.* **2004**, *555*, 65-80. (b) Baur, J. A.; Sinclair, D. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 493-506. (c) Athar, M.; Back, J. H.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Kim, A.L.; Arch. *Biochem. Biophys.* **2009**, *486*, 95-102. (d) Kroon, P. A.; Iyer, A.; Chunduri, P.; Chan, V.; Brown, L. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2442-2455.
 20. a) Kimura, Y.; Sumiyoshi, M.; Baba, K. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 2083-2096. (b) Cottart, C.-H.; Nivet-Antoine, V.; Laguillier-Morizot, C.; Beaudoux, J. L. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 7-16. (c) Amri, A.; Chaumeil, J. C.; Sfar, S.; Charrueau, C. *J. Contr. Release* **2012**, *158*, 182-193.
 21. (a) Lion, C. J.; Matthews, C. S.; Stevens, M. F. G.; Westwell, A. D. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1292-1295. (b) Heynekamp, J. J.; Weber, W. M.; Hunsaker, L. A.; Gonzales, A. M.; Orlando, R. A.; Deck, L. M.; Jagt, D. L. V. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7182-7189. (c) Belluti, F.; Fontana, G.; Dal, B. L.; Carenini, N.; Giannarelli, C.; Zunino, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3543-3550. (d) Li, H.; Wu, W. K.; Zheng, Z.; Che, C. T.; Li, Z. J.; Xu, D. D.; Wong, C. C.; Ye, C. G.; Sung, J. J.; Cho, C. H.; Wang, M. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *637*, 55-61. (e) Xianfeng H.; Zhu, H.-L. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 479-490. (f) Svajger, U.; Jeras, M. *Int. Rev. Immunol.* **2012**, *31*, 202-222. (g) Whitlock, N. C.; Baek, S. J. *Nutr. Cancer* **2012**, *64*, 493-502. (h) López-Lluch, G.; Cruz-Calvo, S. S.; Navas, P. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 1338-1344.
 22. (a) Ali, M. A.; Kondo, K.; Tsuda, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1130-1136. (b) McNulty, J.; Das, P.; McLeod, D. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6756-6760. (c) Chalal, M.; Vervandier-Fasseur, D.; Meunier, P.; Cattey, H.; Hierso, J.-C. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3899-3907.
 23. (a) Bumagin, N. A.; Bykov, V. V.; Sukhomlinova, L. I.; Tolstaya, T. P.; Beletskaya, I. P. *J. Organometal. Chem.* **1995**, *486*, 259-262. (b) Arvela, R. K.; Leadbeater, N. E. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1786-1790. (c) Wang, J.-X.; Wang, K.; Zhao, L.; Li, H.; Fu, Y.; Hu, Y. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1262-1270. (d) Huang, S.-H.; Chen, J.-R.; Tsai, F.-Y. *Molecules* **2010**, *15*, 315-330. (e) Shahzad, S. A.; Venin, C.; Wirth, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3465-3472. See also ref. 21c.
 24. Jeffery, T. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 10113-10130.
 25. Mehta, V. P.; Van der Eycken, E. V. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4925-4936.
 26. (a) Igura, K.; Ohta, T.; Kuroda, Y.; Kaji, K. *Cancer Lett.* **2001**, *171*, 11-16. (b) Cao, Y.; Fu, Z.D.; Wang, F.; Liu, H.Y.; Han, R. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2005**, *7*, 205-213. (c) Alex, D.; Leong, E. C.; Zhang, Z. J.; Yan, G. T. H.; Cheng, S. H.; Leong, C. W.; Li, Z. H.; Lam, K. H.; Chan, S. W.; Lee, S. M. *J. Cell Biochem* **2010**, *109*, 339-346.
 27. Kimura, Y.; Sumiyoshi, M.; Baba, K. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 2083-2096.
 28. Black, M.; Cadogan, J. I. G.; McNab, H.; MacPherson, A. D.; Roddam, V. P.; Smith, C.; Swenson, H. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 2483-2493.
 29. Gospodarowicz, D.; Moran, J.; Braun, D.; Birdwell, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 4120-4124.
 30. Rodríguez-Nieto, S.; Medina, M. A.; Quesada, A. R. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 3457-3460.
 31. Rodríguez-Nieto, S.; González-Iriarte, M.; Carmona, R.; Muñoz-Chapuli, R.; Medina, M. A.; Quesada, A. R. *FASEB J.* **2002**, *16*, 261-263.
 32. Hahm, E.-R.; Gho, Y.S.; Park, S.; Park, C.; Kim, K.-W.; Yang, C.-H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2004**, *321*, 337-344.

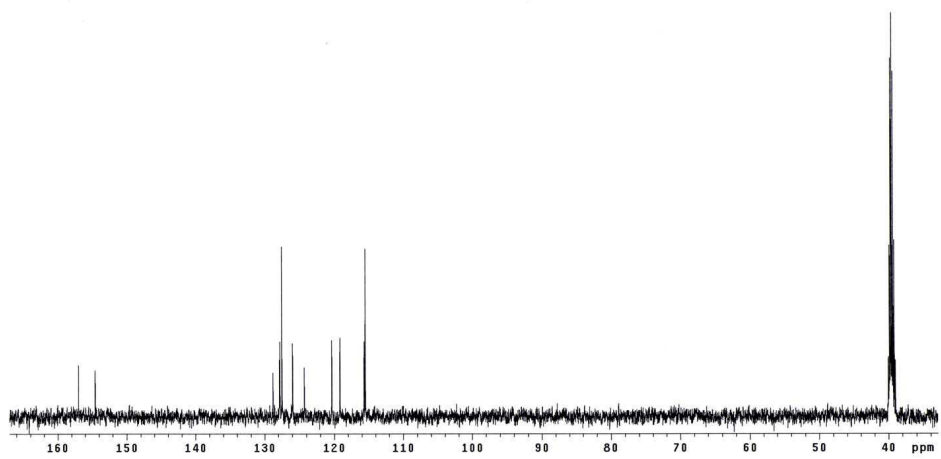
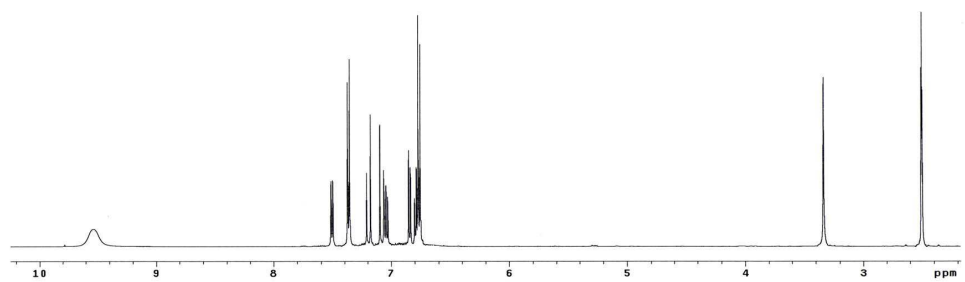
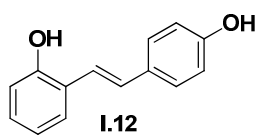
CAPÍTULO 8

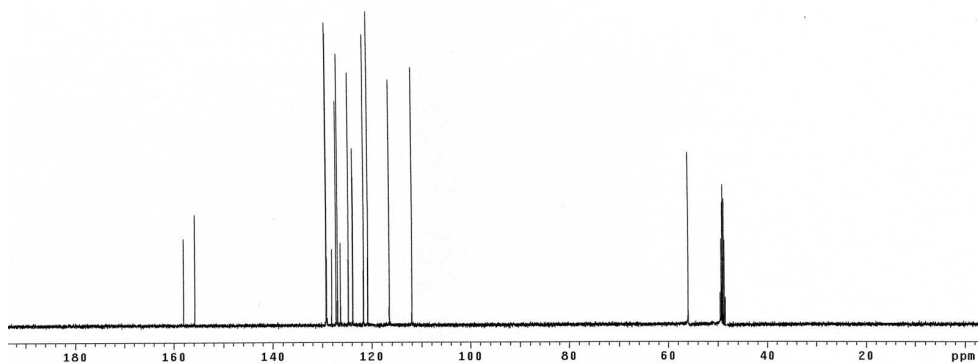
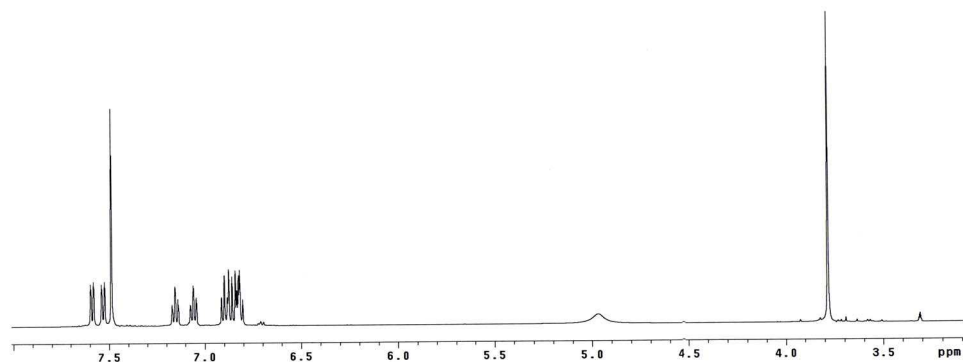
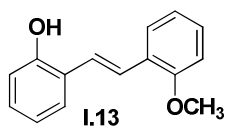
ESPECTROS

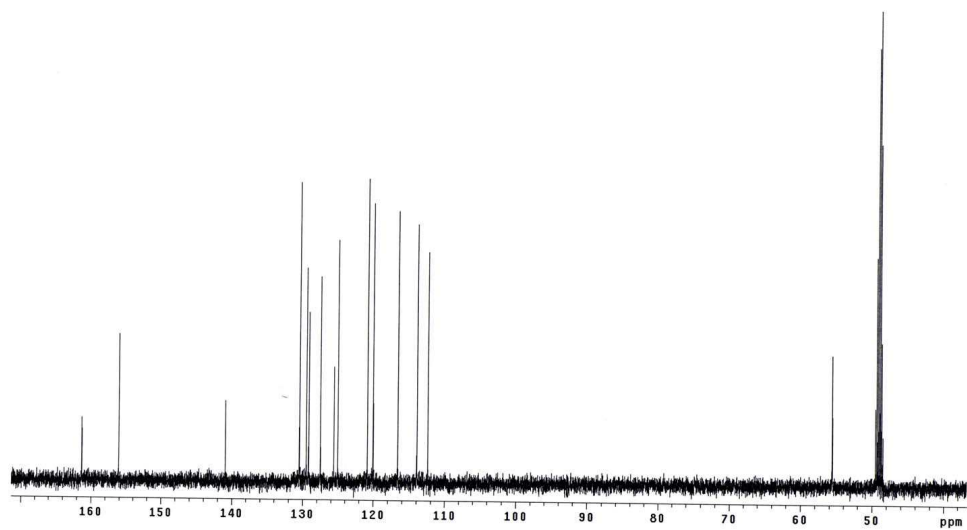
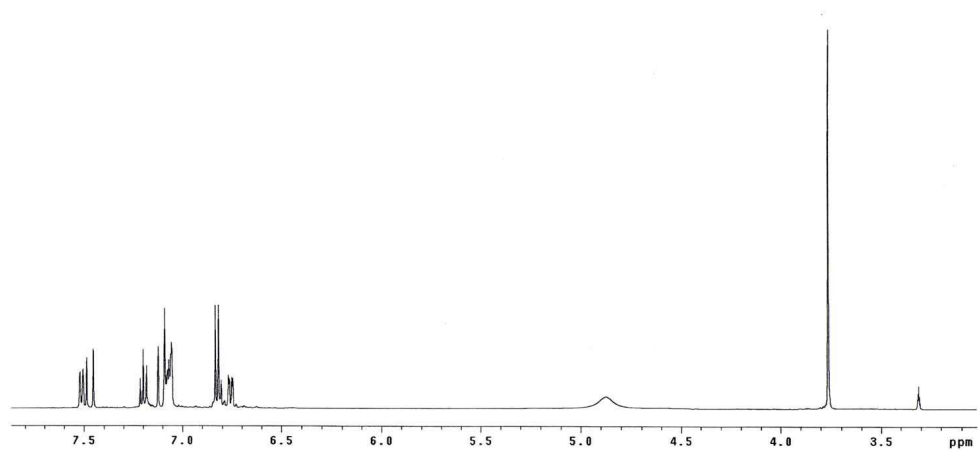
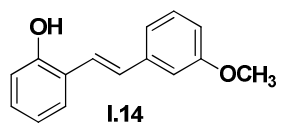
SELECCIONADOS

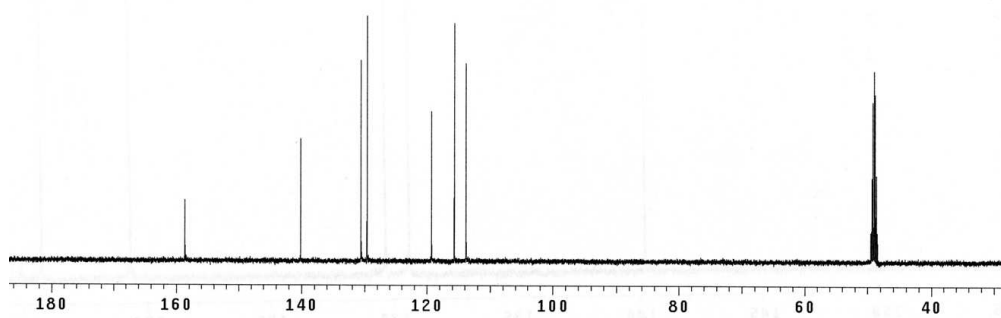
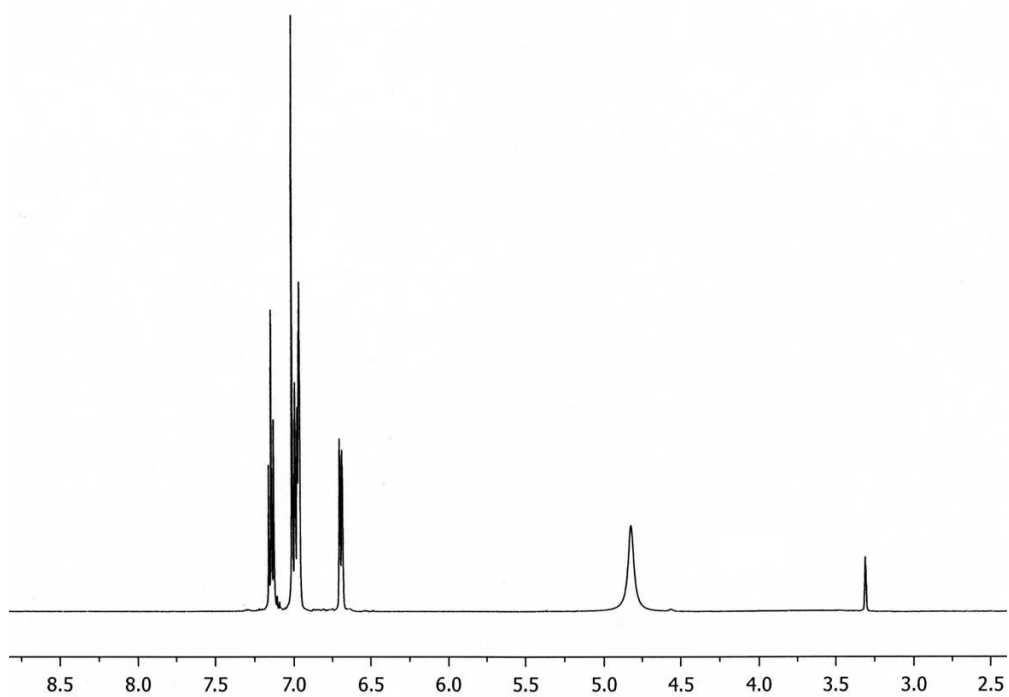
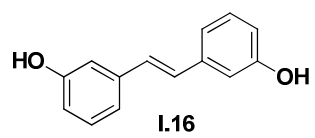
CAPÍTULO 8. ESPECTROS SELECCIONADOS

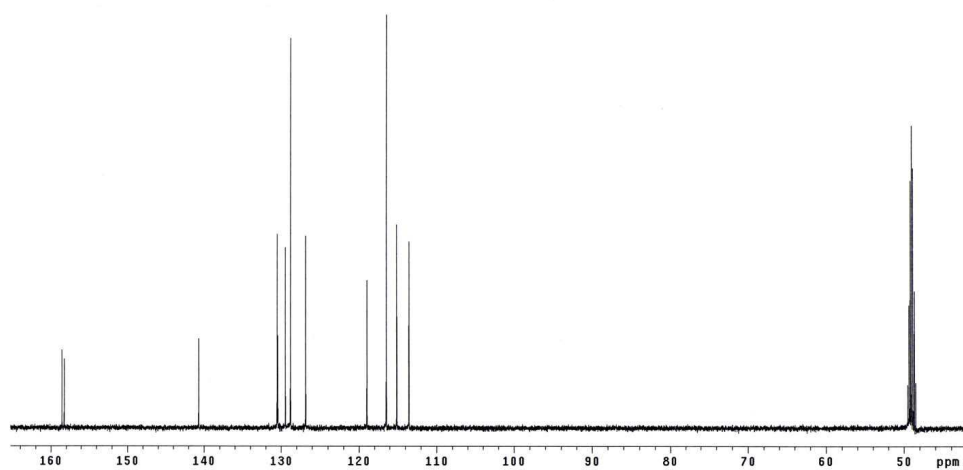
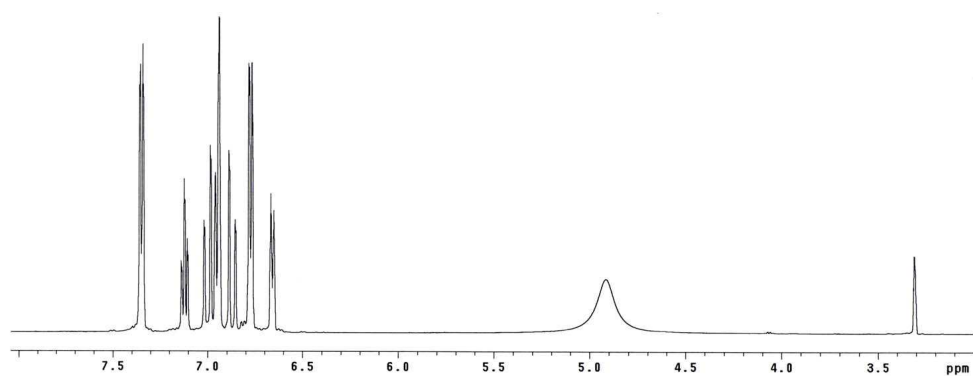
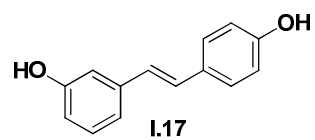


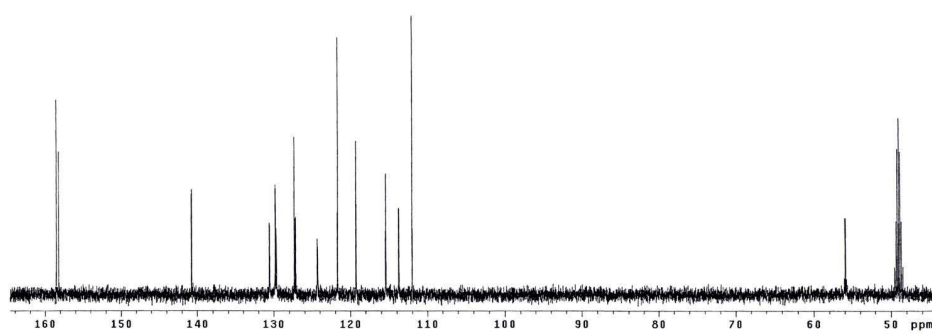
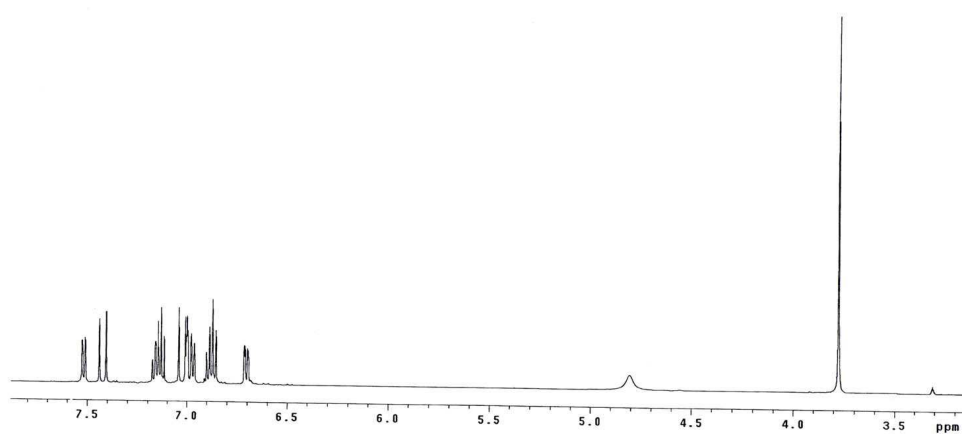
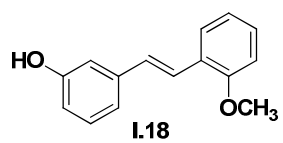


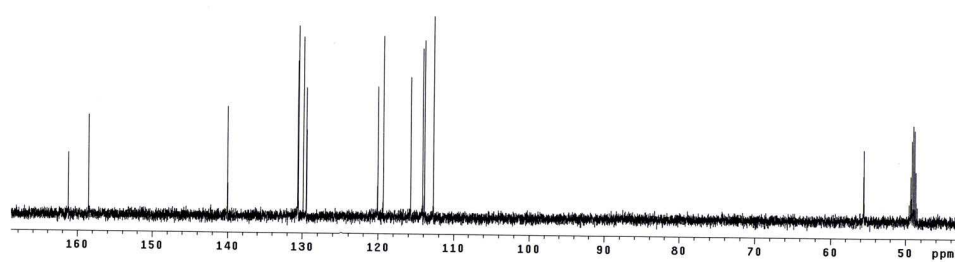
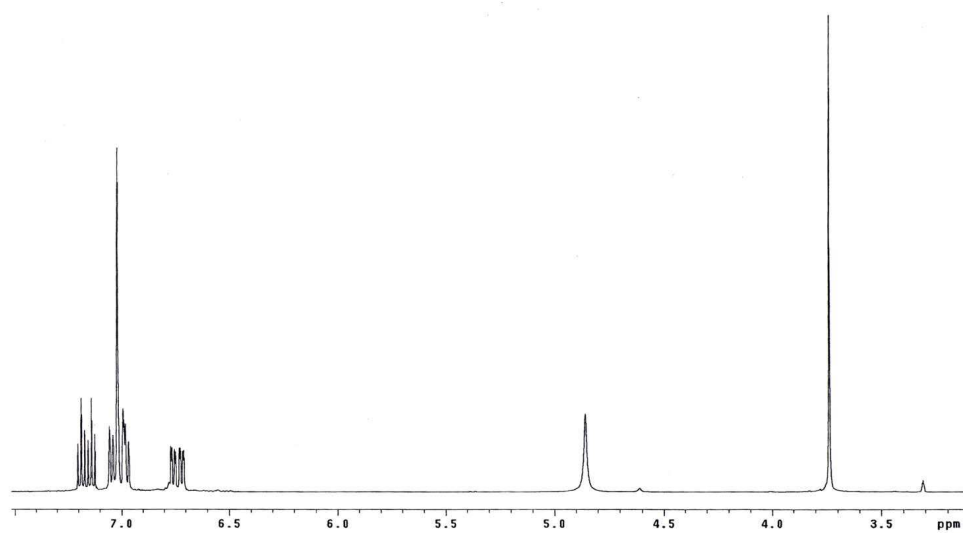
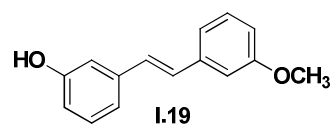


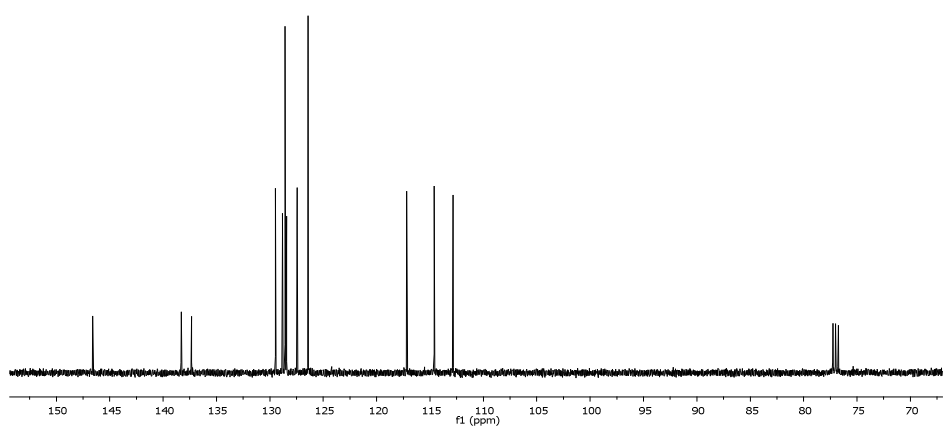
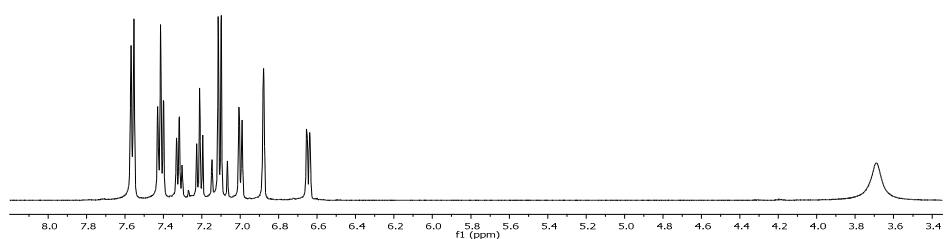
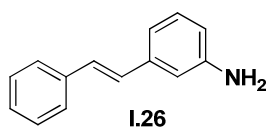


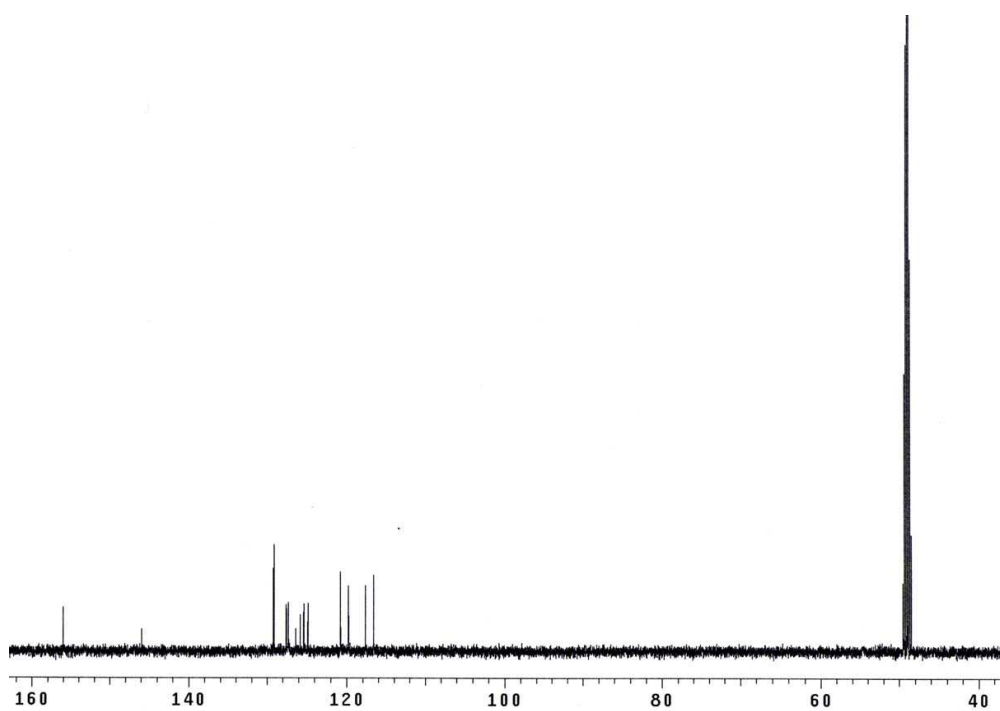
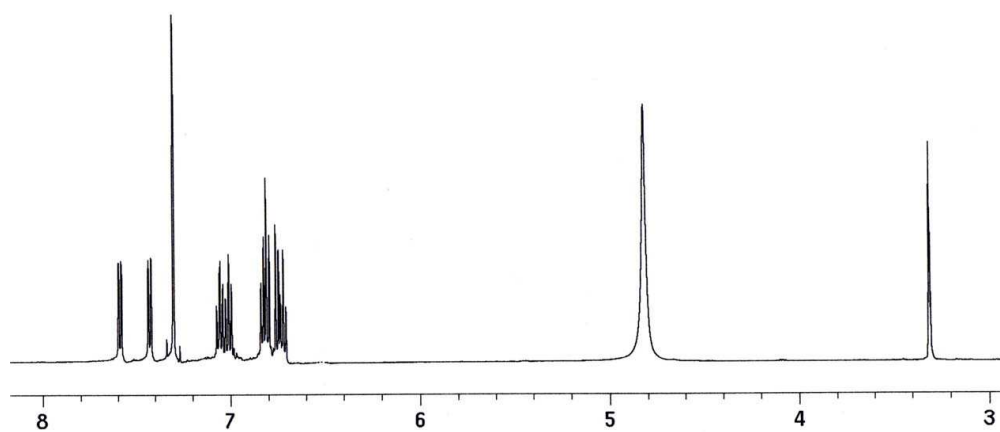
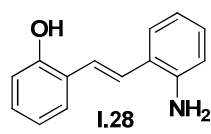


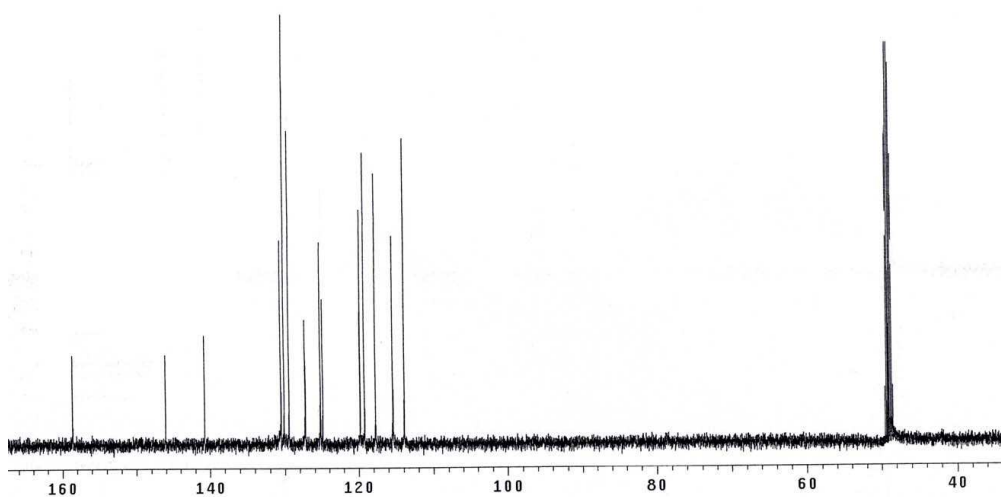
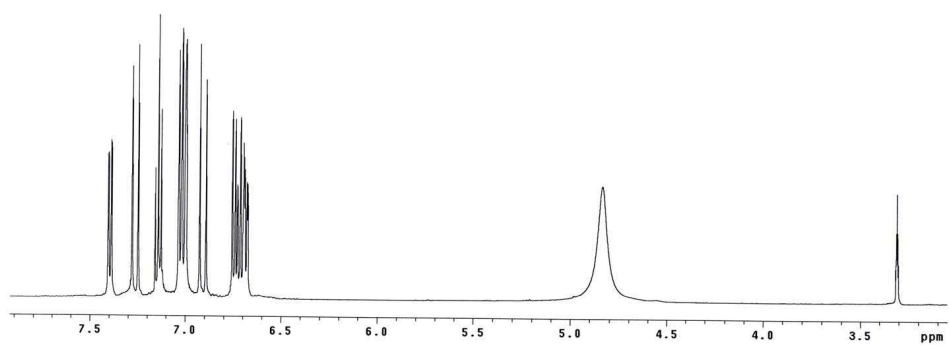
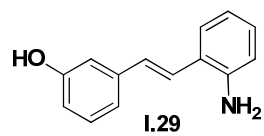


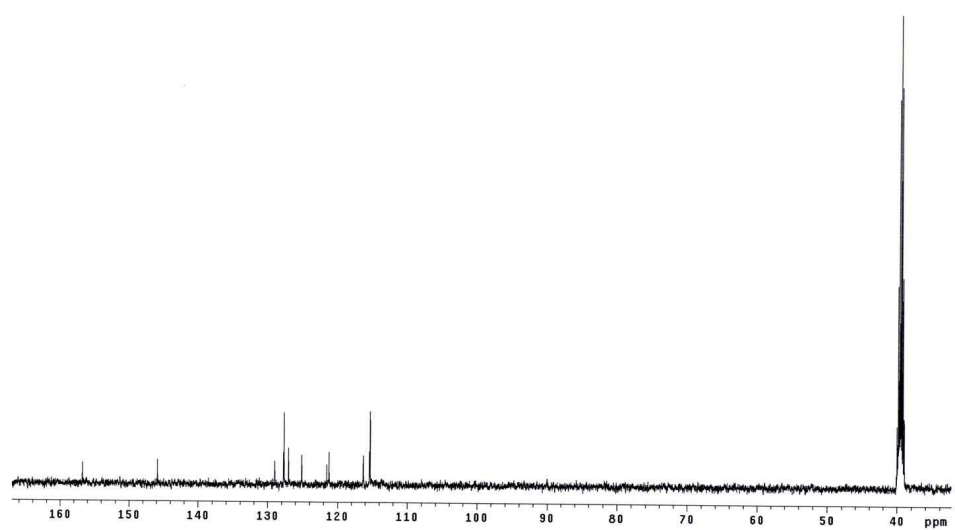
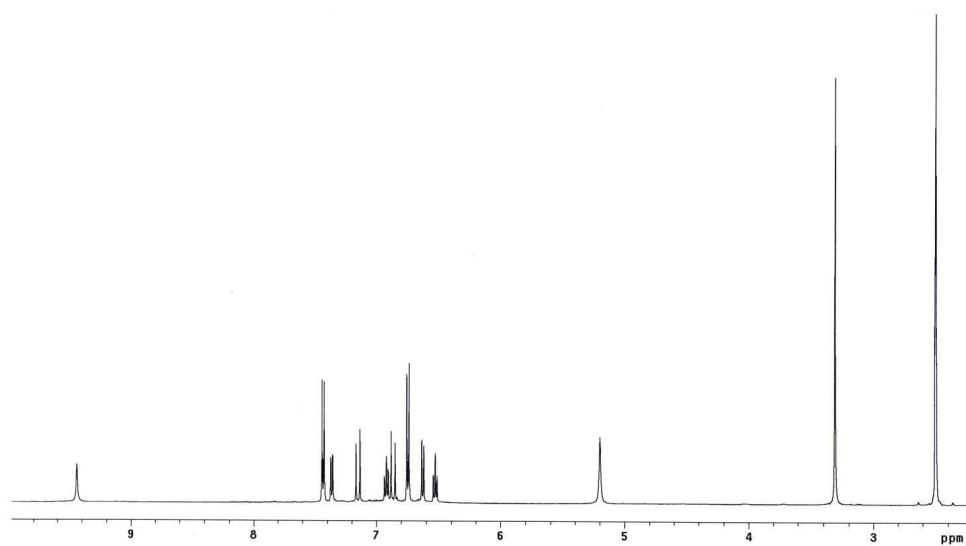
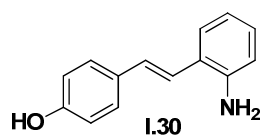


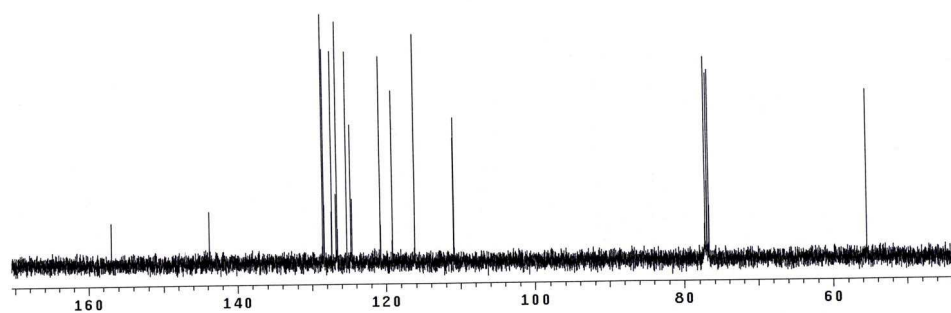
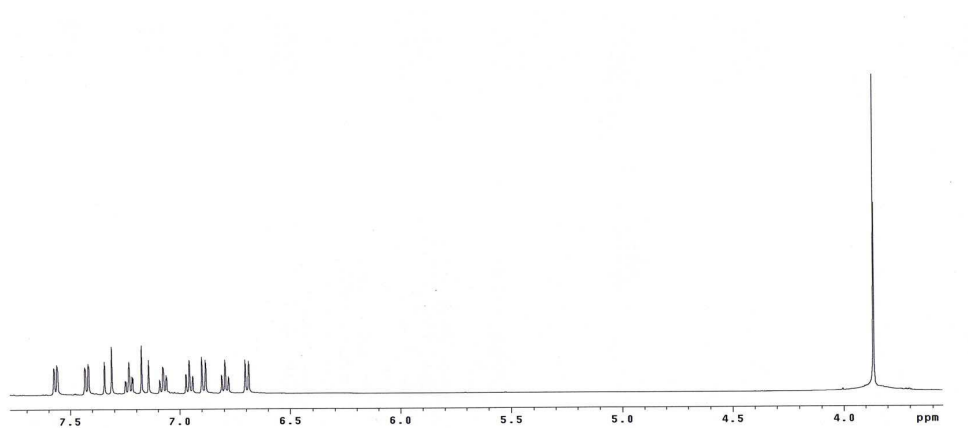
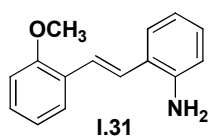


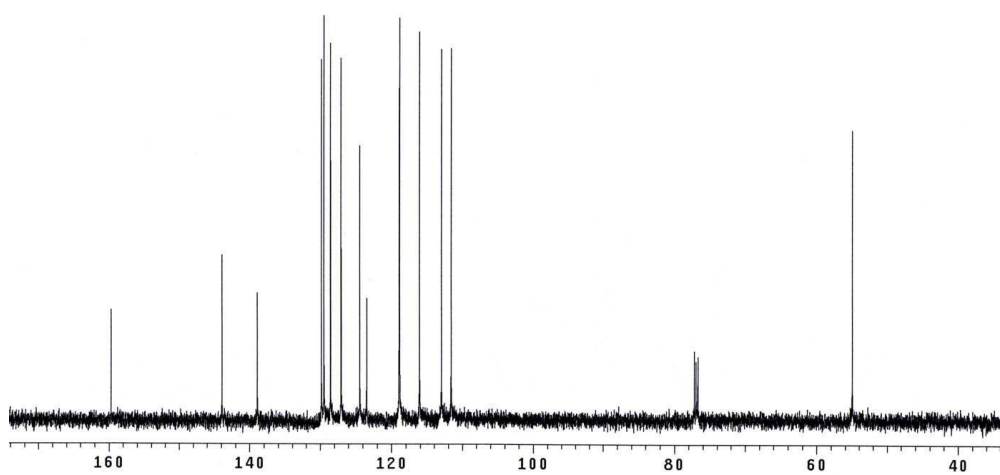
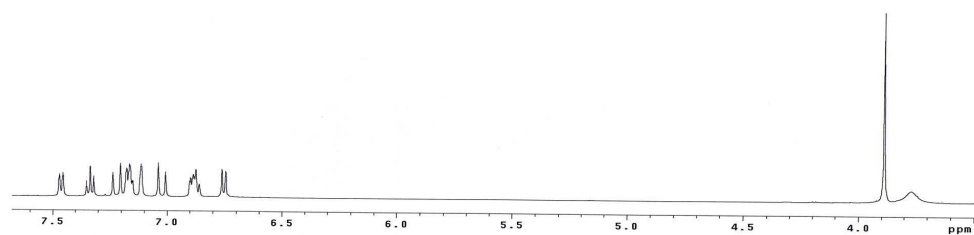
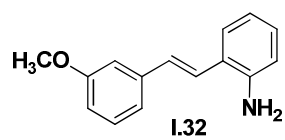


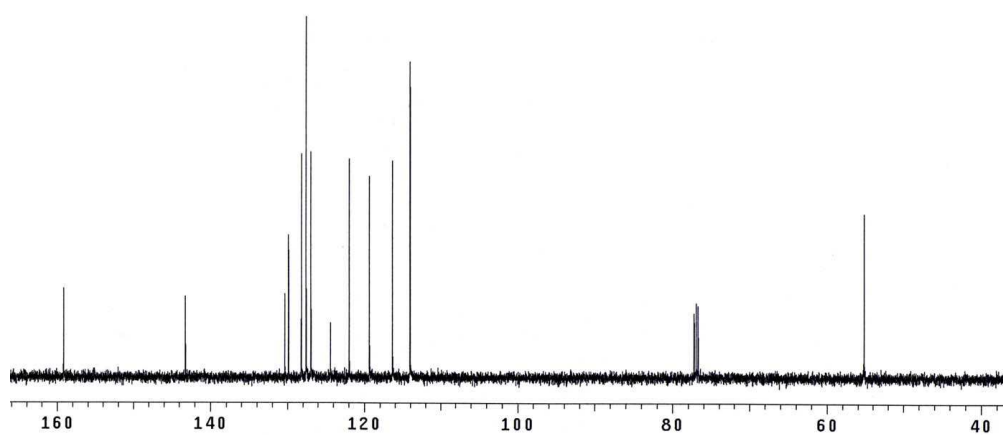
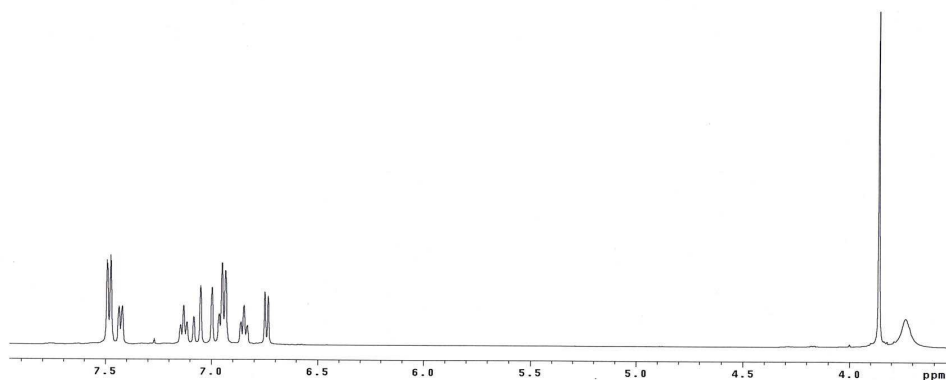
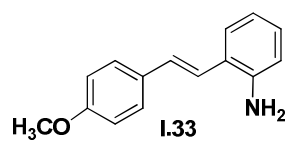


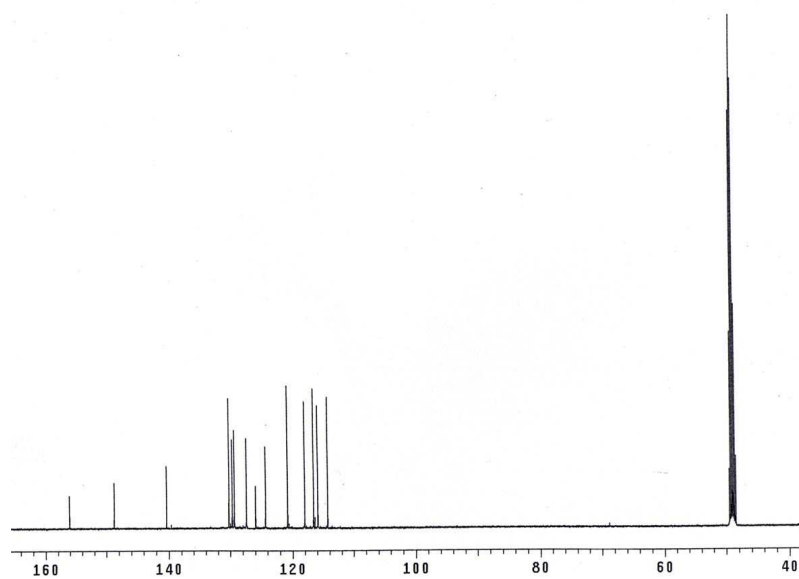
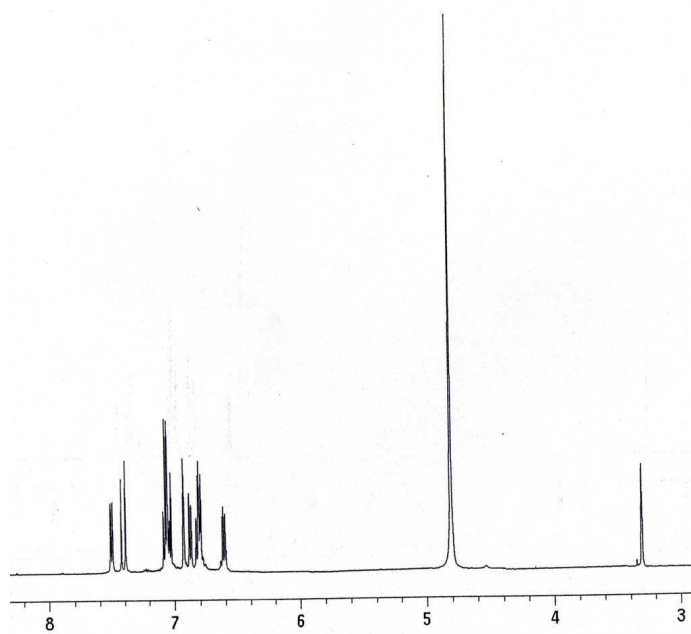
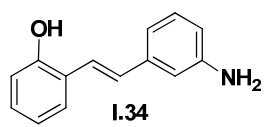


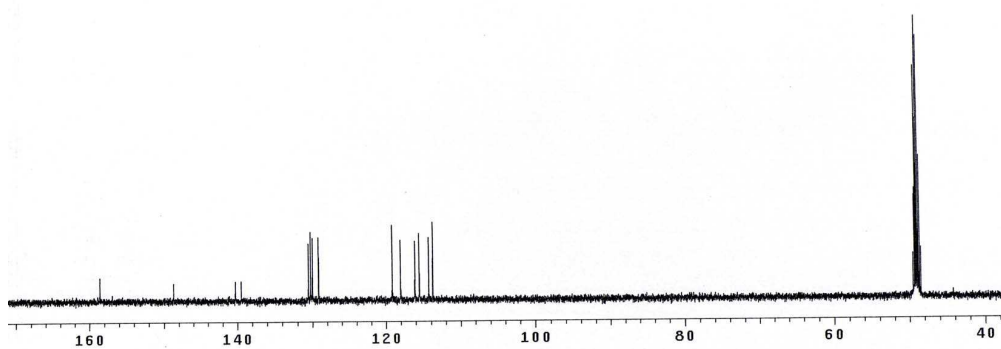
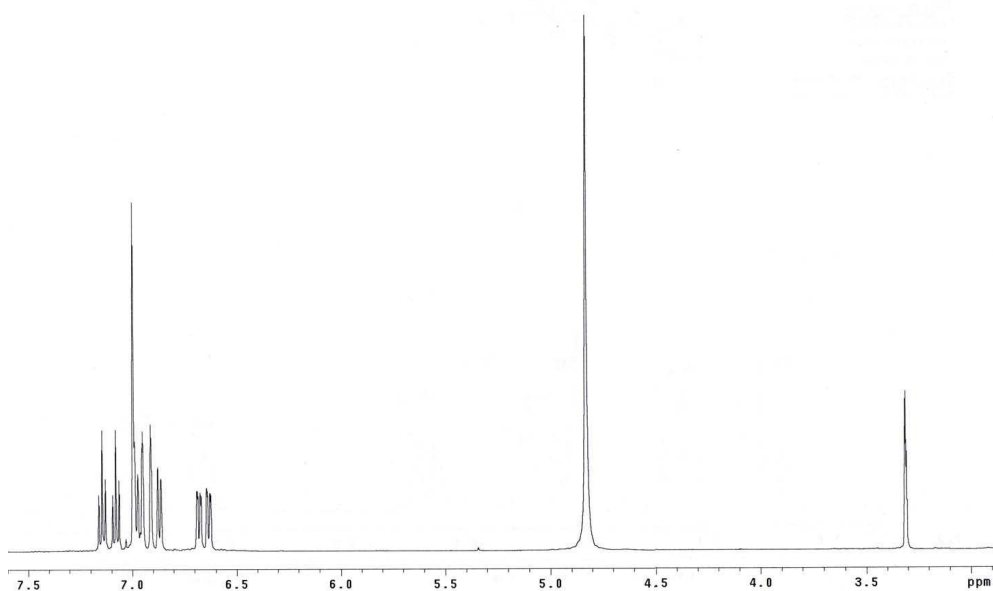
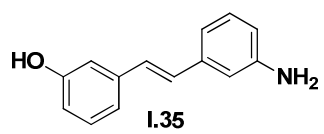


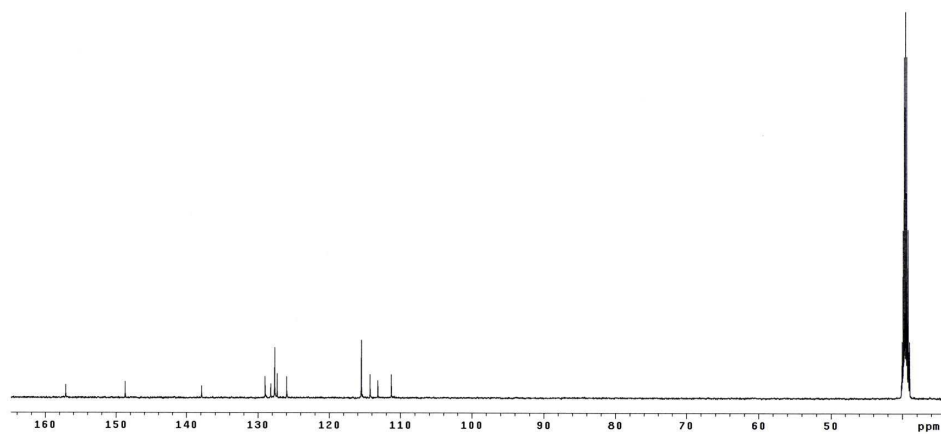
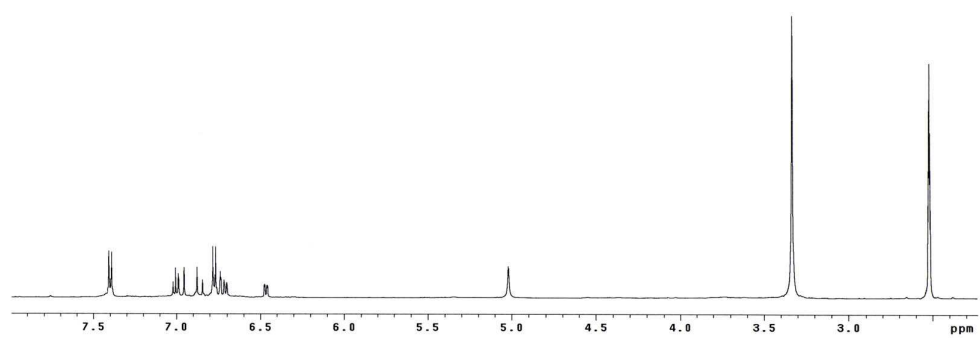
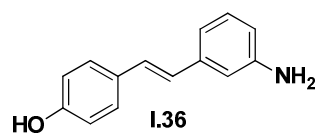


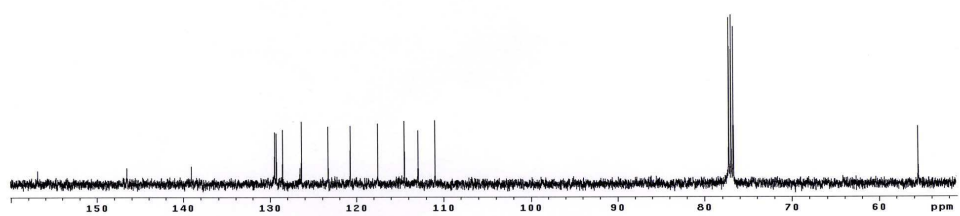
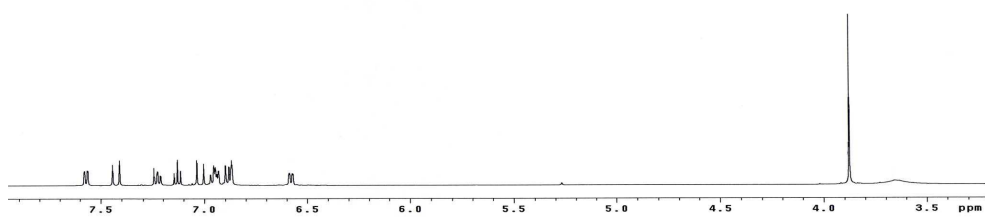
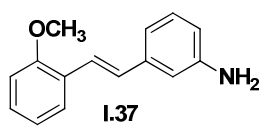


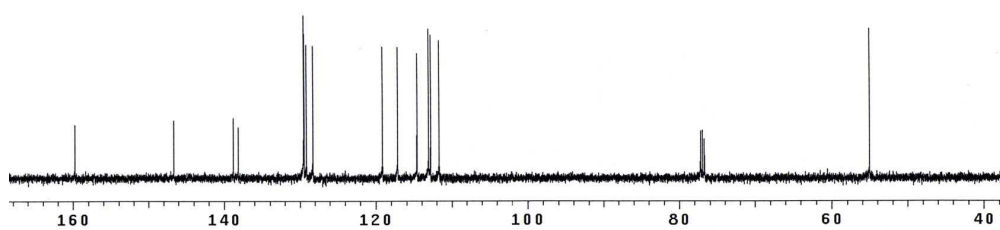
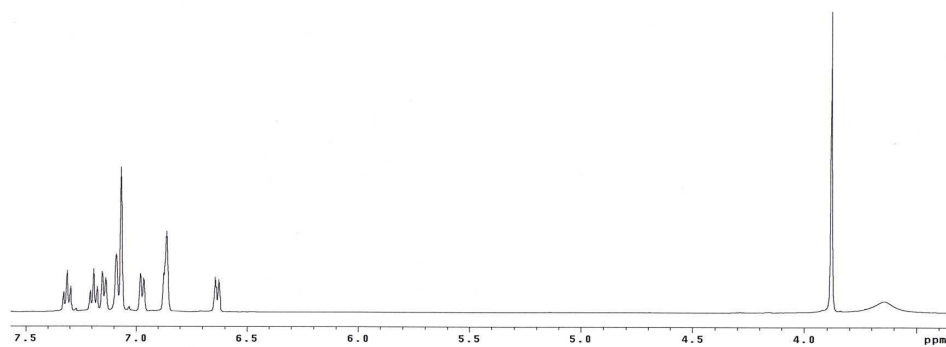
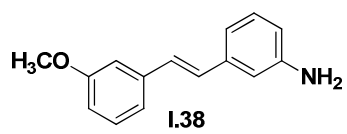


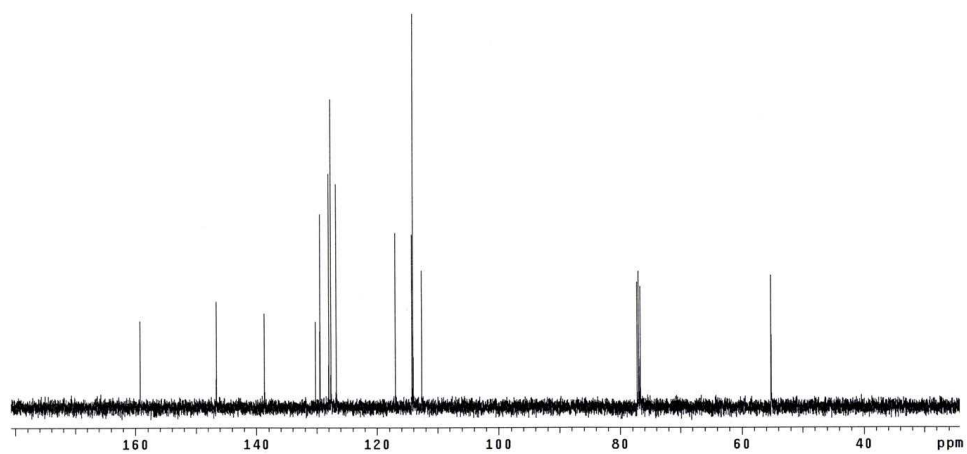
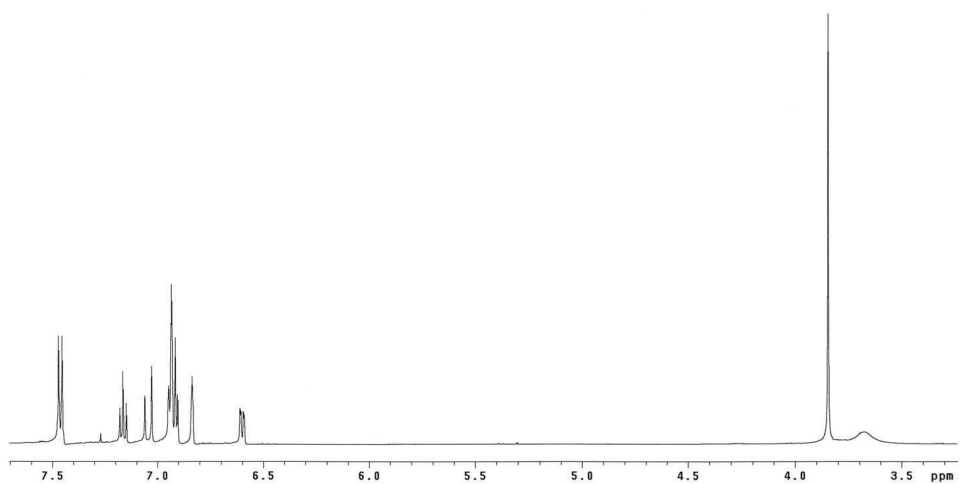
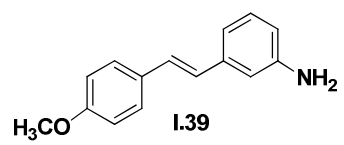


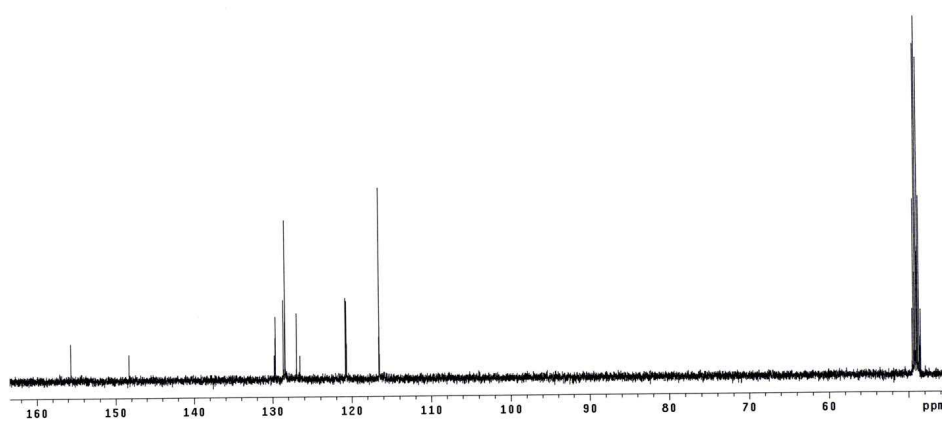
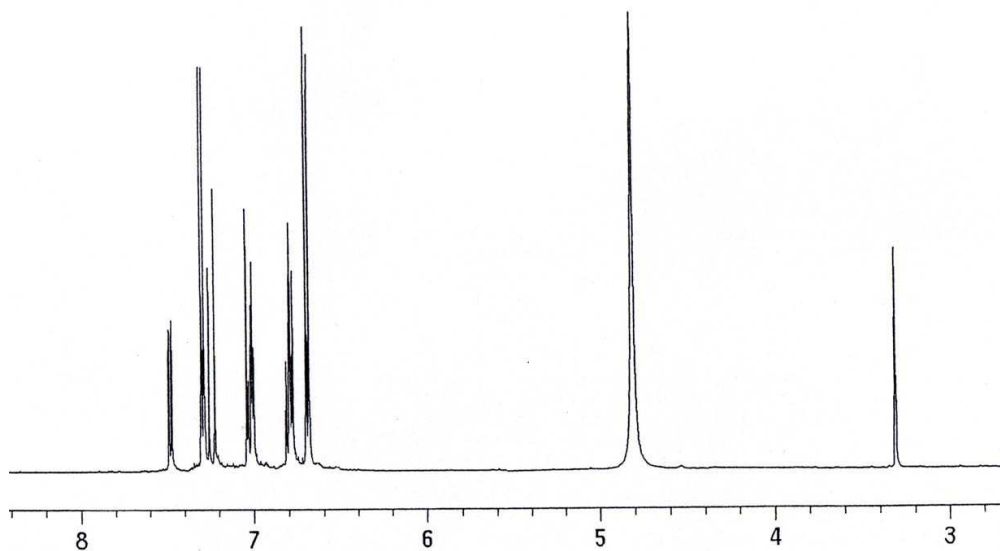
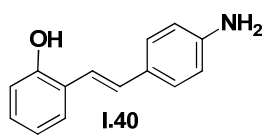


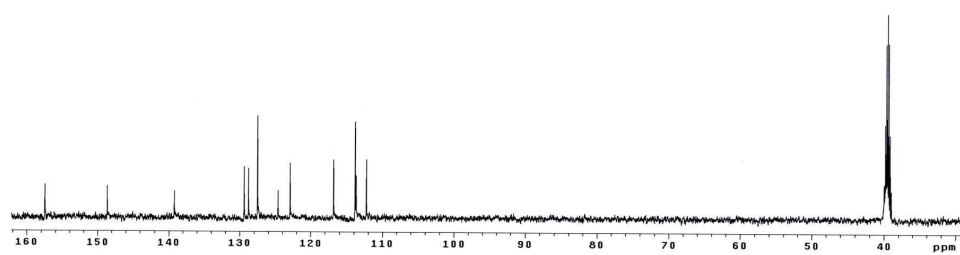
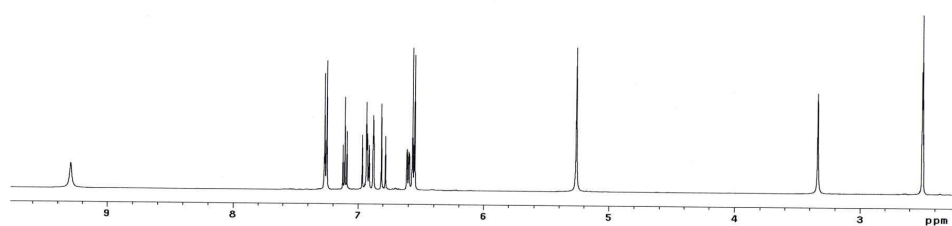
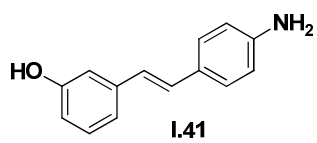


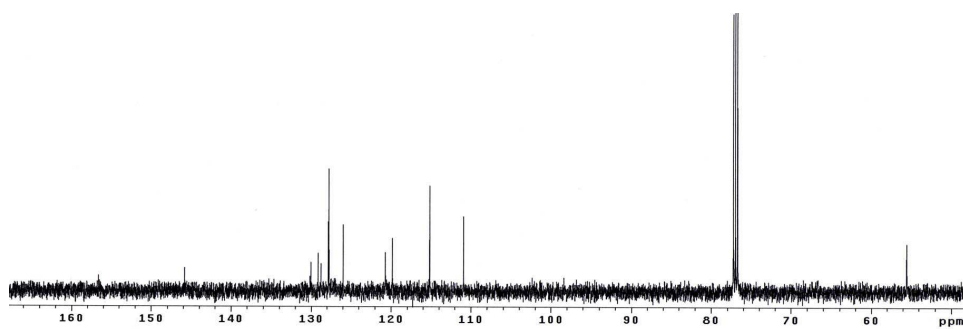
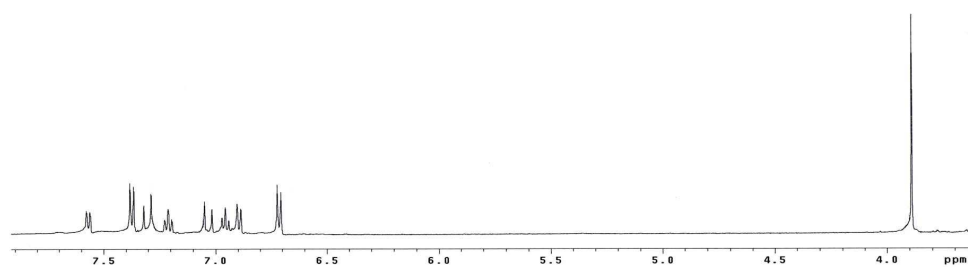
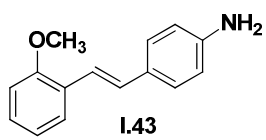


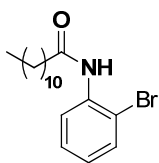




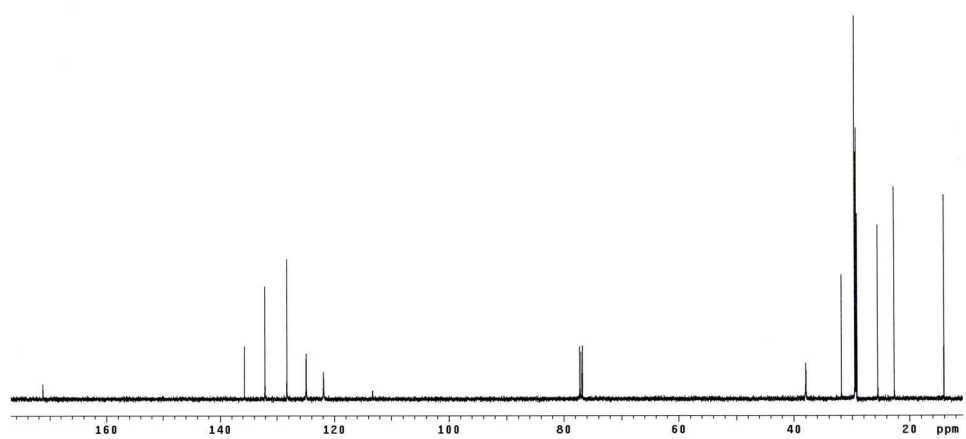
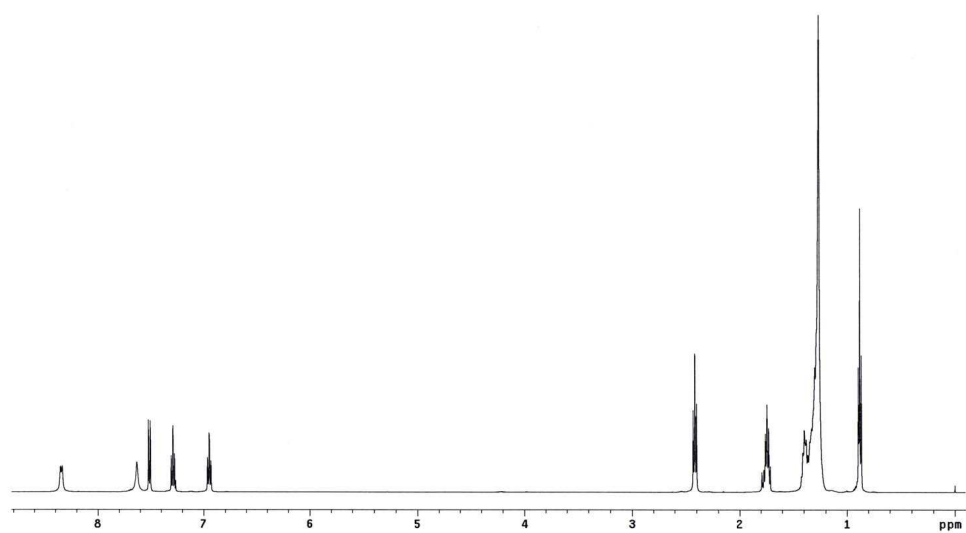


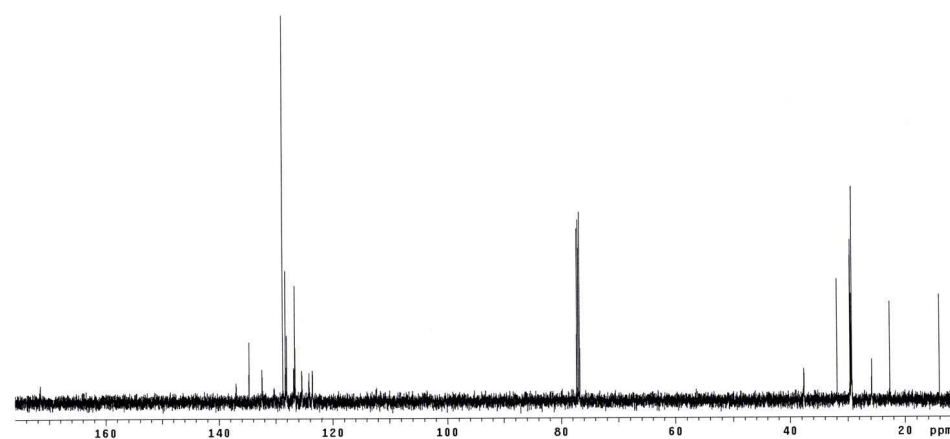
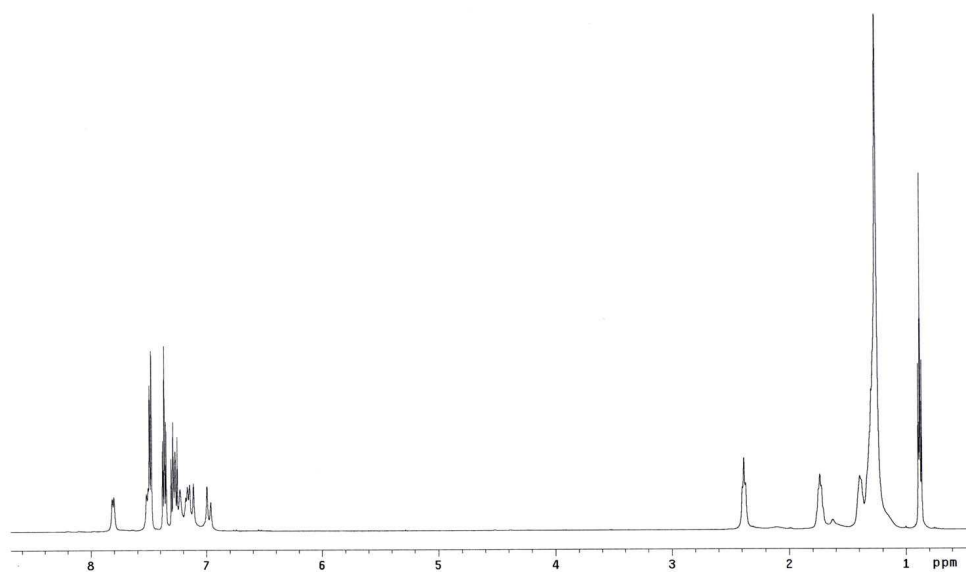
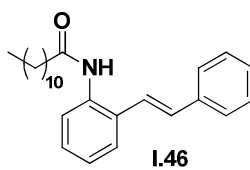


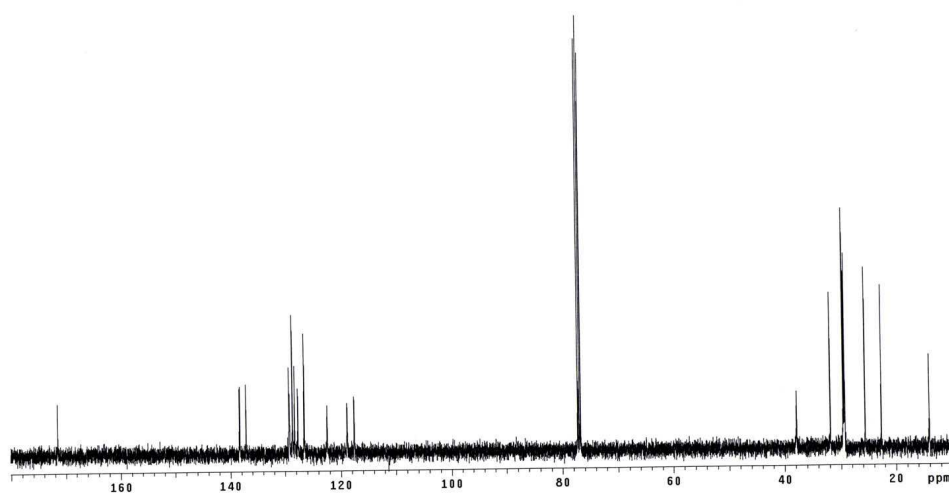
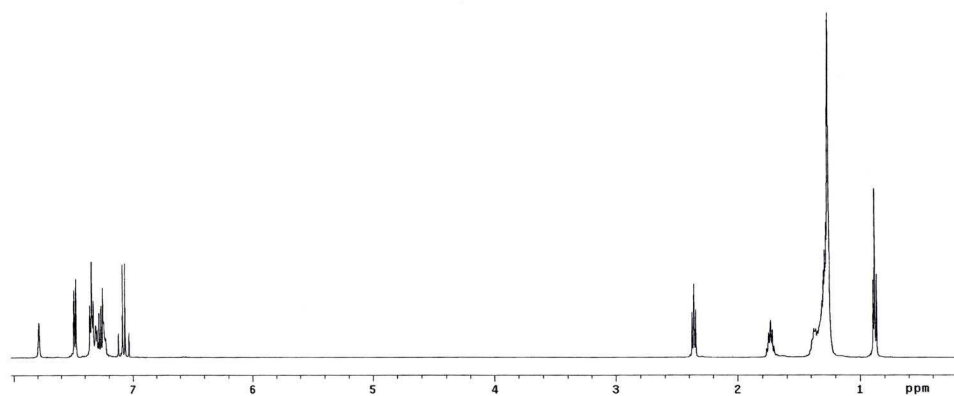
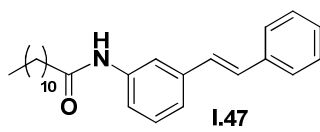


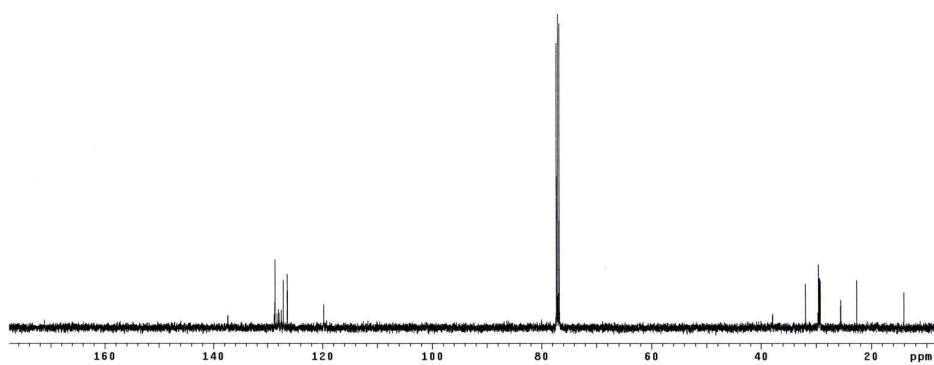
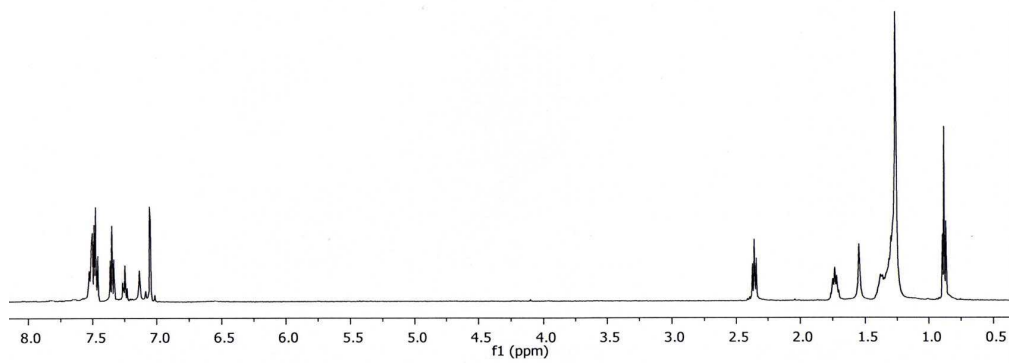
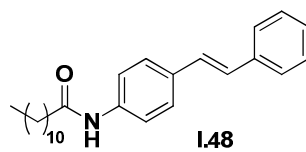


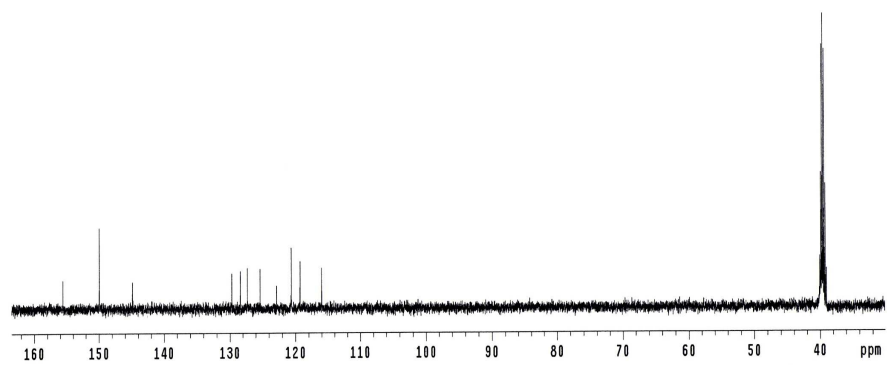
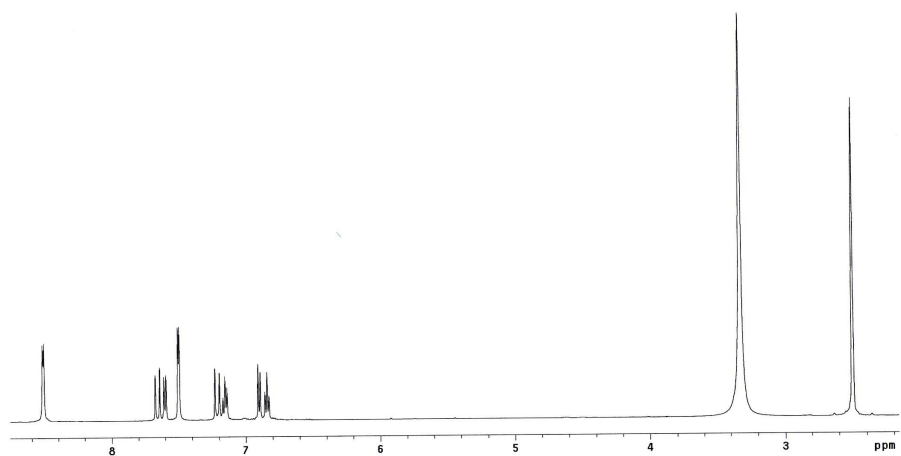
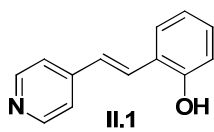
N-(2-bromofenil)dodecanamida

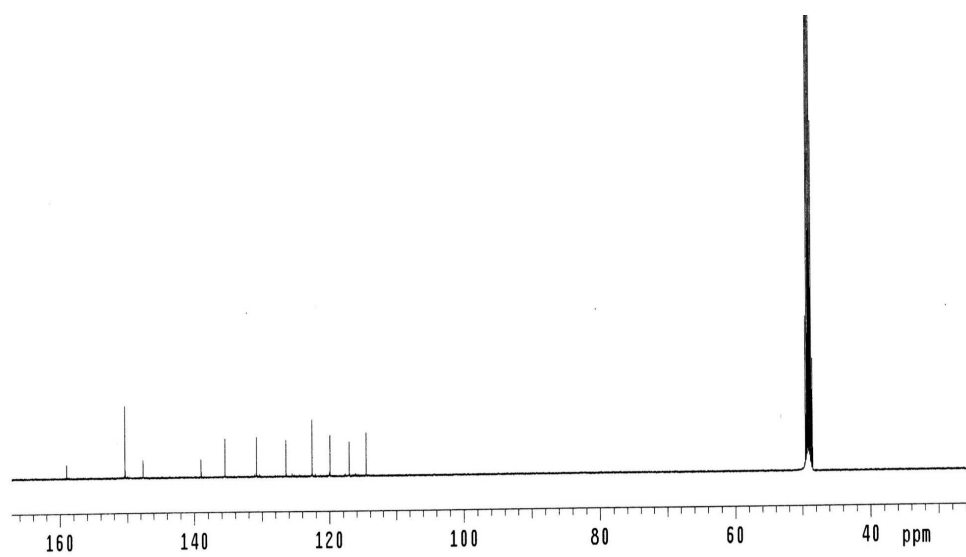
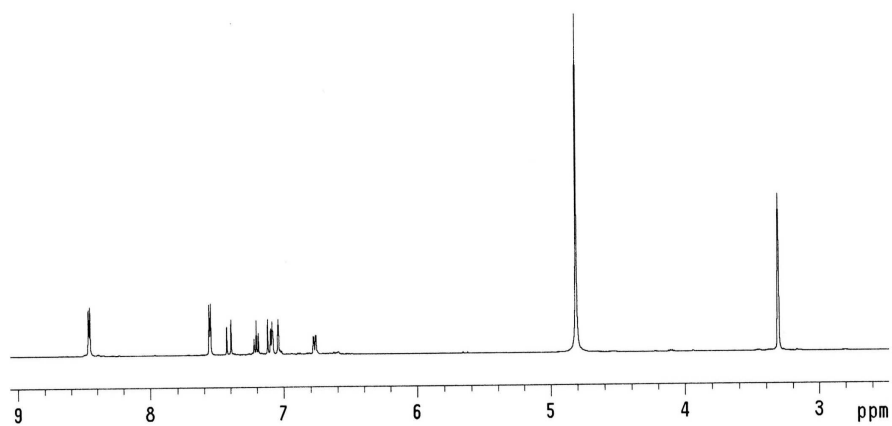
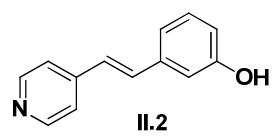


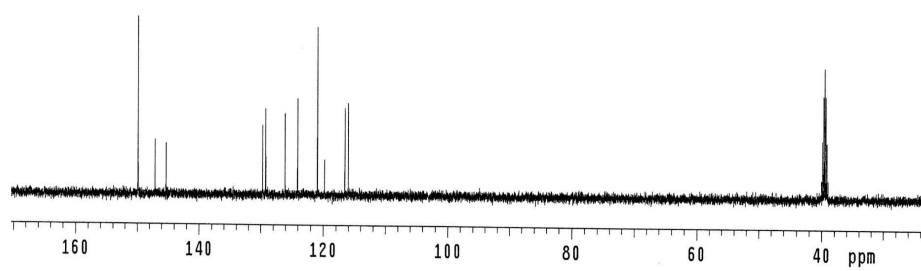
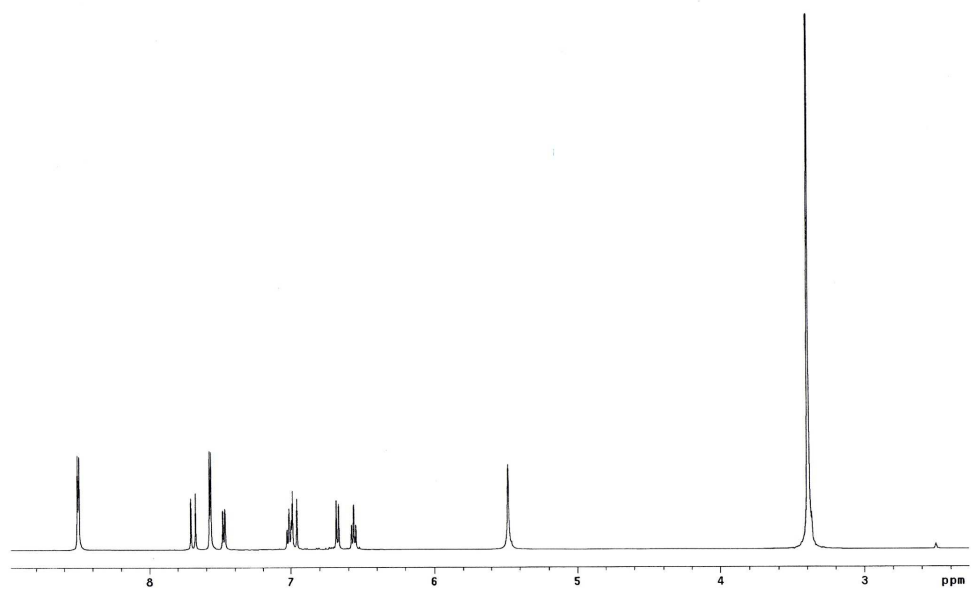
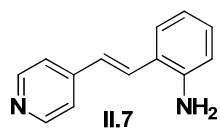


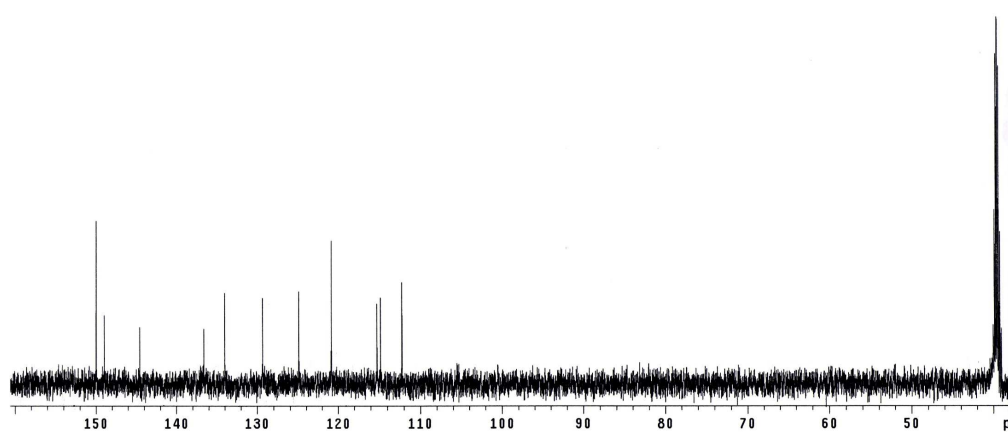
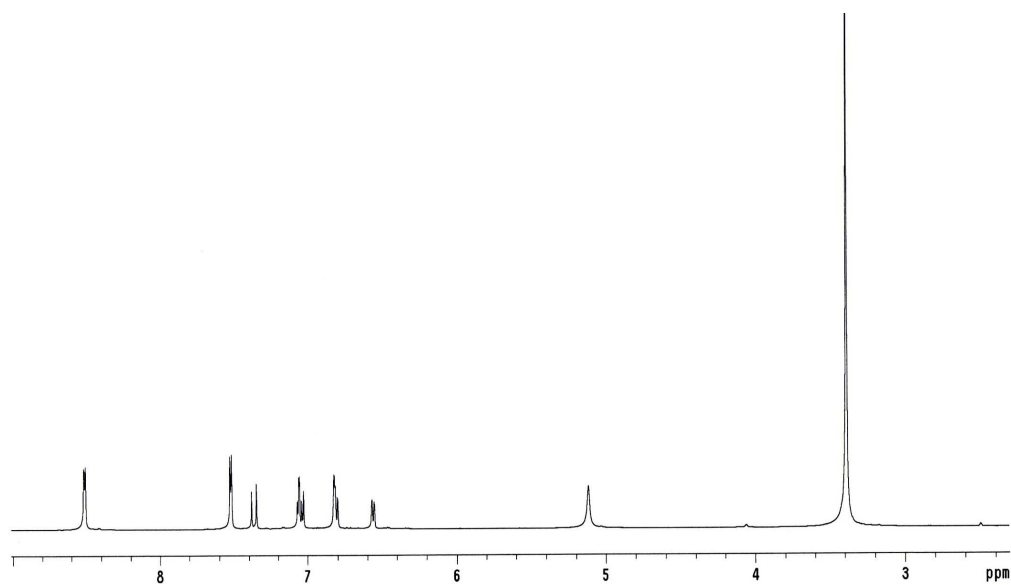
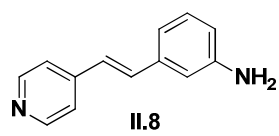


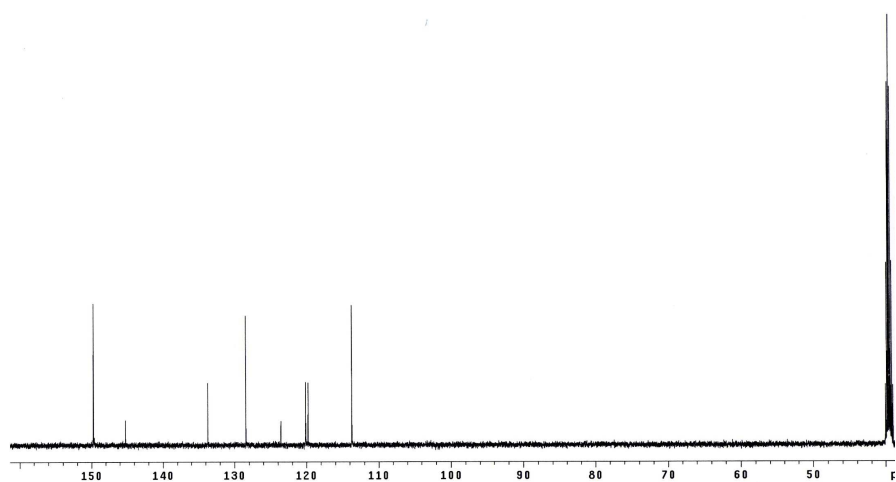
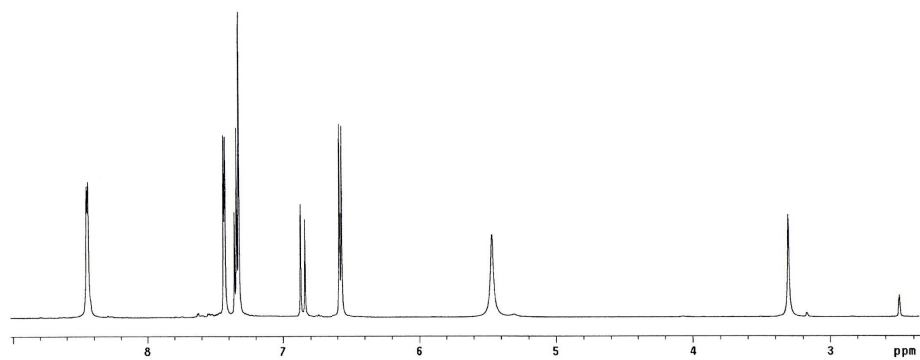
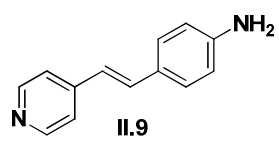


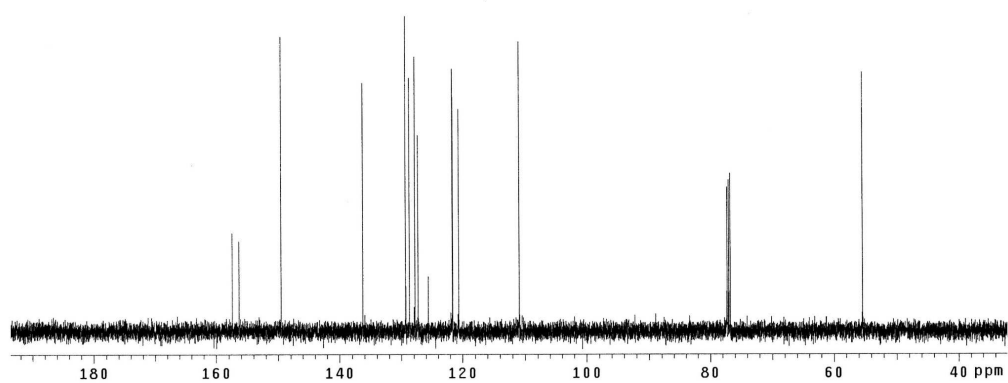
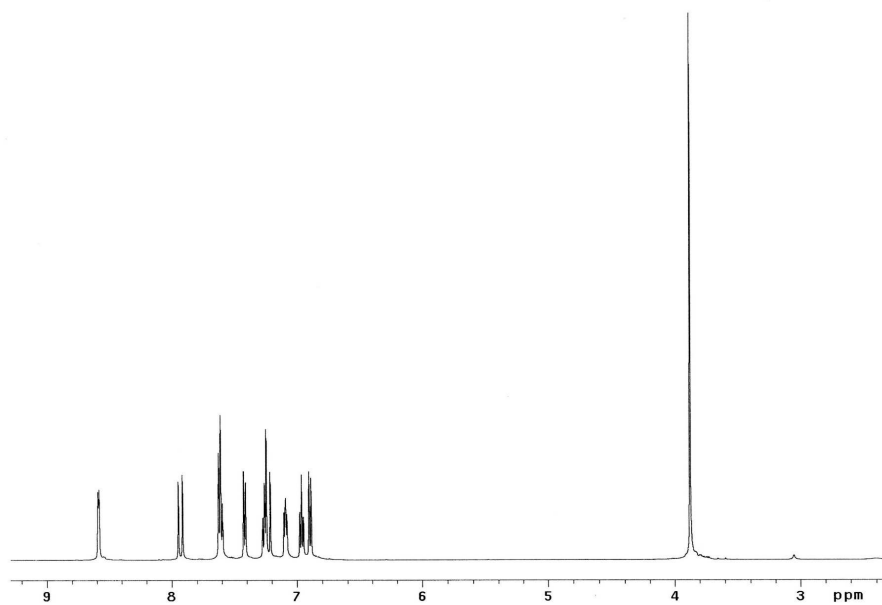
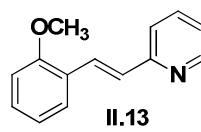


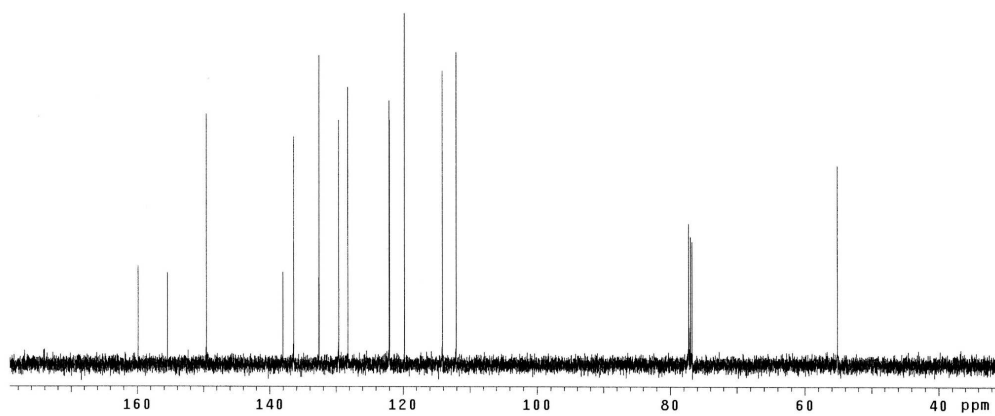
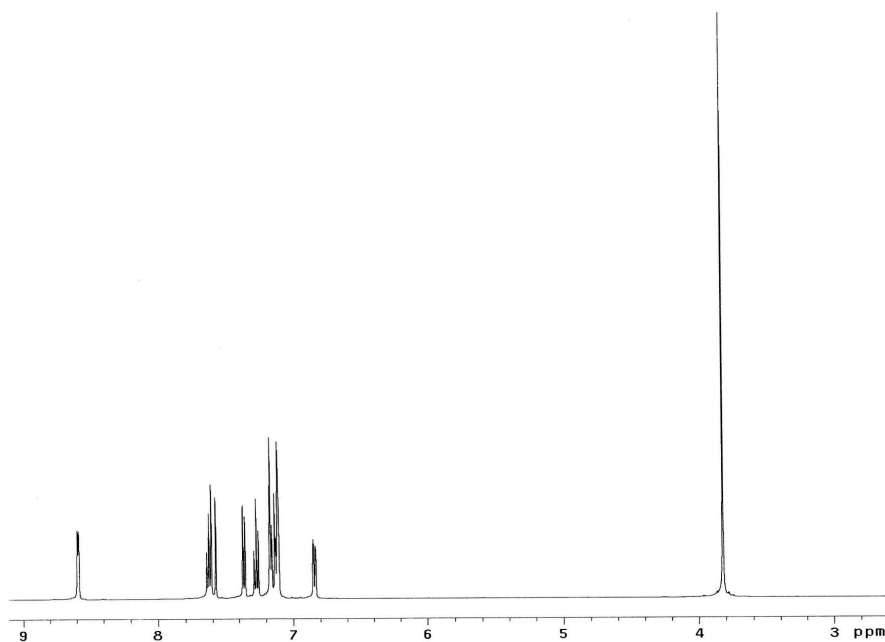
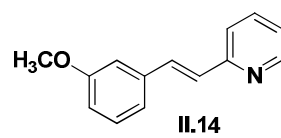


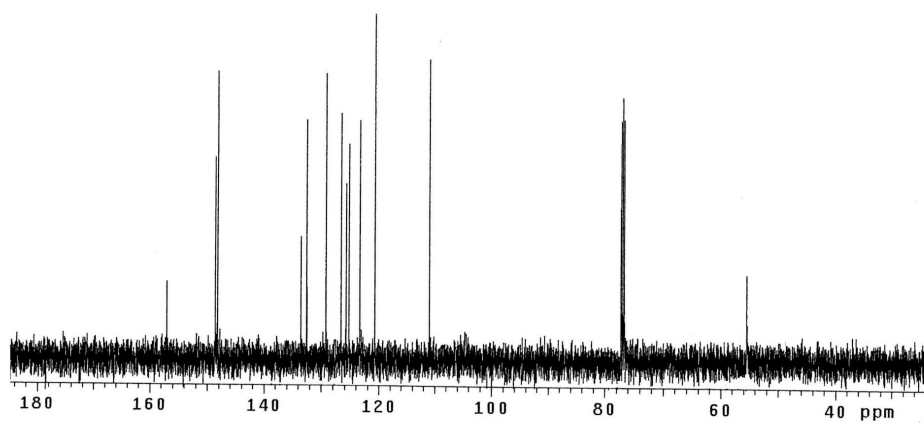
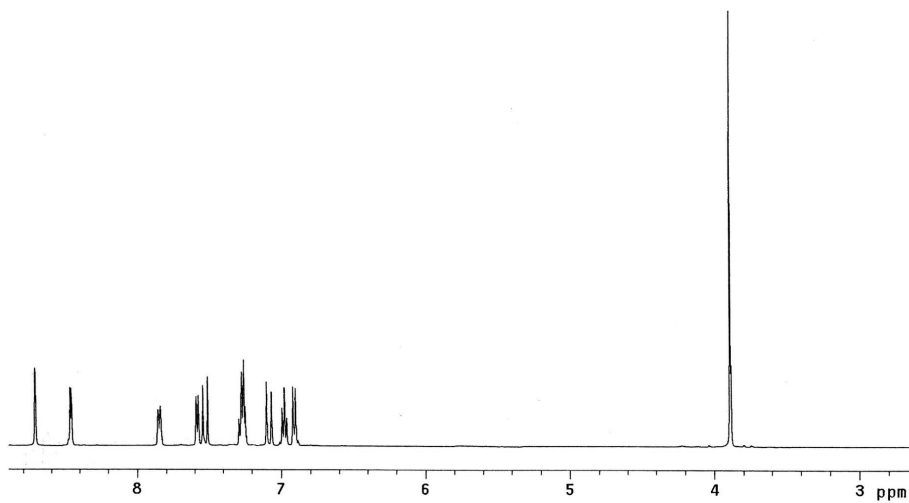
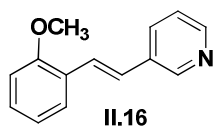


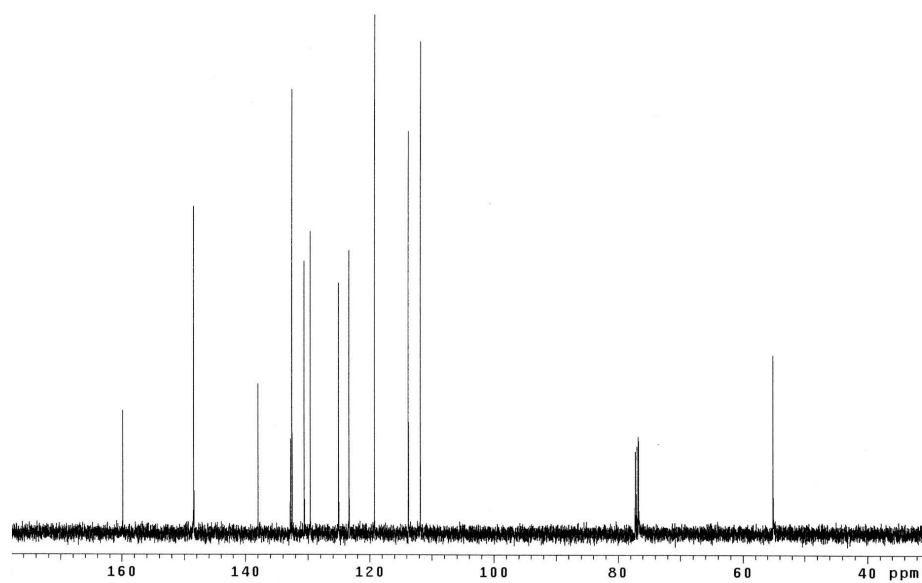
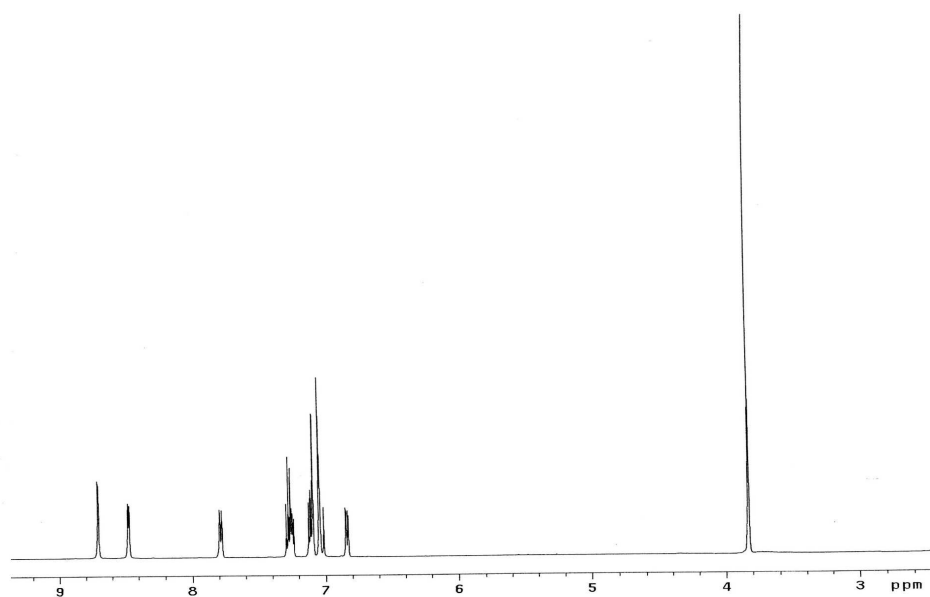
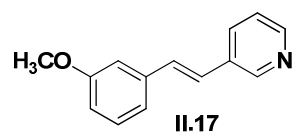


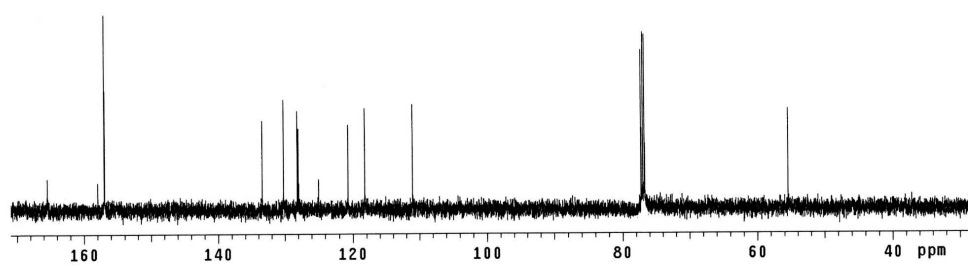
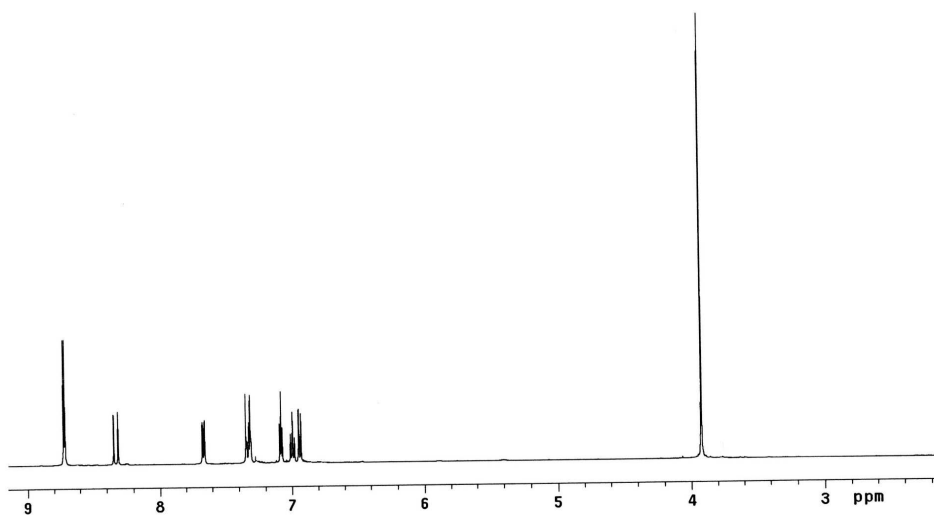
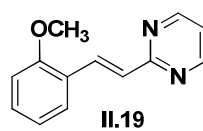


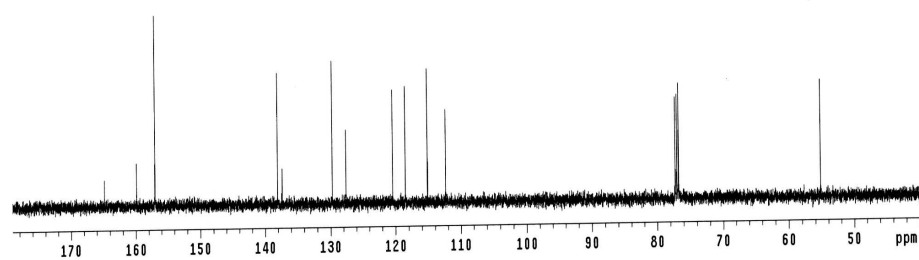
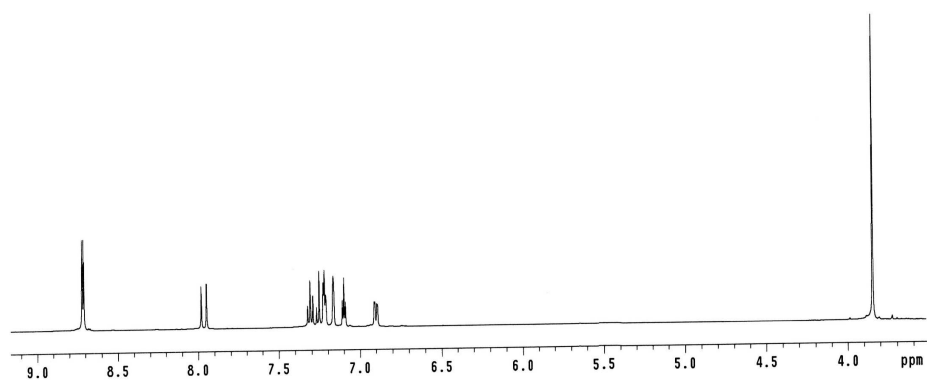
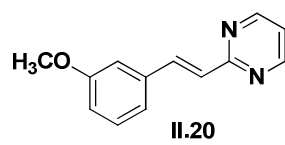


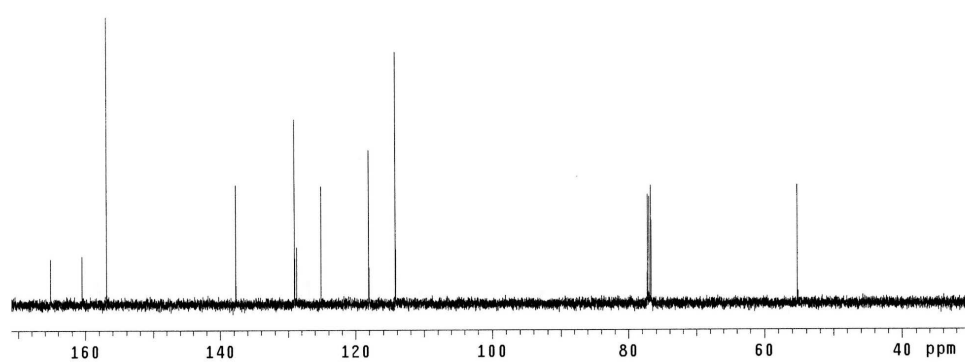
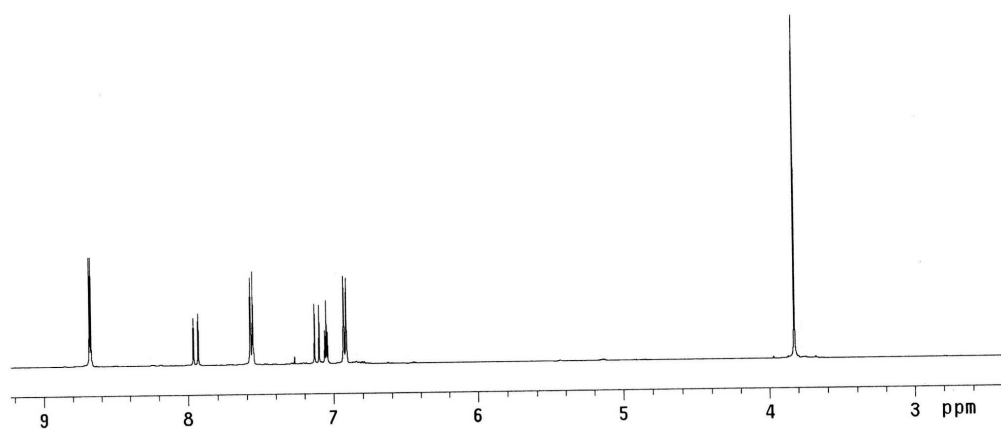
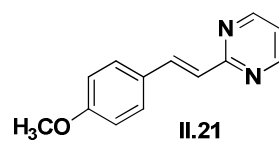


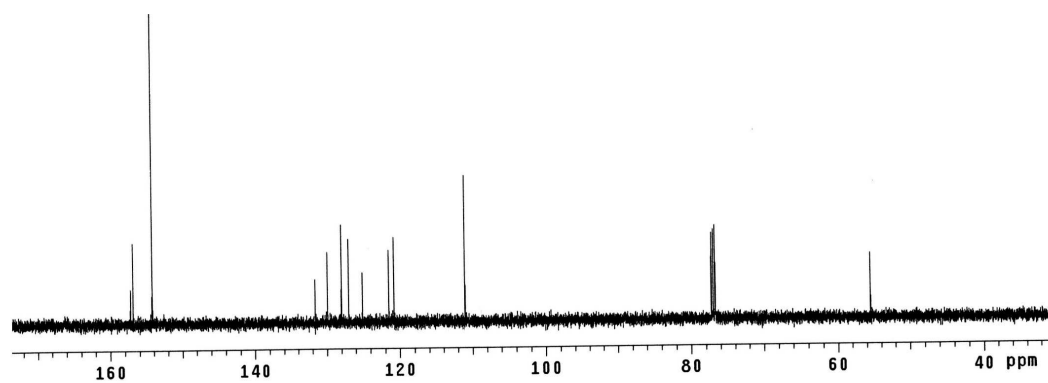
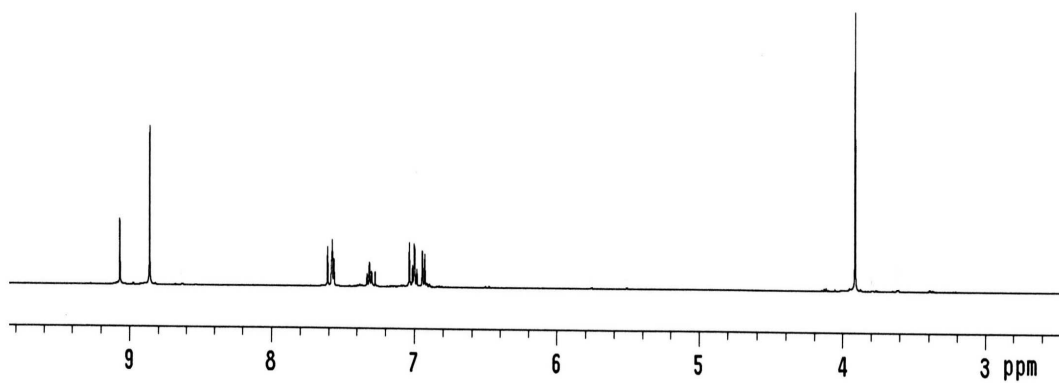
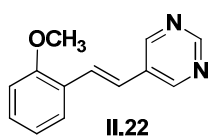












COc1ccc(cc1)/C=C/c2ccnnc2

II.23

